

Universidad Pública de Navarra

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**INHIBICIÓN DEL PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO EN PATATA UTILIZANDO
EXTRACTOS DE PEREJIL**

presentado por

BERNAT BORRÀS VALLVERDÚ *(e)k*

aurkeztua

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS
AGROALIMENTARIAS**

***UNIBERTSITATE MASTERRA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN INDUSTRIETAKO
TEKNOLOGIAN ETA KAITATEAN***

Junio, 2018 / 2018, *ekaina*

Resumen

El pardeamiento enzimático es una de las principales causas de alteración organoléptica y nutricional en frutas y verduras. Debido al estilo de vida actual, en los últimos años ha crecido el consumo de productos de IV gama, cuya susceptibilidad por el pardeamiento enzimático hace que tengan una vida útil reducida.

Los compuestos más utilizados en la actualidad para prevenir el pardeamiento enzimático en patata mínimamente procesada (PMP) son los sulfitos. El empleo de sulfitos puede causar reacciones alérgicas a personas que sufren asma, además de presentar otras limitaciones como provocar reblandecimiento y disminución del valor nutritivo en los alimentos tratados. La industria alimentaria necesita reemplazar los sulfitos por compuestos alternativos que permitan retrasar el pardeamiento enzimático sin ocasionar los efectos indeseables de los sulfitos.

Teniendo en cuenta que el mercado valora mejor los aditivos naturales que los sintéticos, y sabiendo que el perejil es rico en polifenoles y otros compuestos antioxidantes, se plantea el empleo de extractos de perejil como antipardeantes en PMP.

Se realizaron dos tipos de extracciones: una acuosa y otra EtOH/H₂O. Ambas extracciones presentaron importantes capacidades antioxidantes y contenidos de polifenoles totales. Para la extracción acuosa los valores fueron de 7,93 $\mu\text{mol TE/g}$ perejil (sobre ms) y 6,23 mg GAE/g perejil (sobre ms), mientras que para la extracción EtOH/H₂O fueron de 32,79 $\mu\text{mol TE/g}$ perejil (sobre ms) y 6,75 mg GAE/g perejil (sobre ms). También se vio que los extractos eran efectivos a la hora de inhibir la actividad de la PPO de patata cv. *Monalisa* (inhibiciones de 23,41 y 48,47% para los extractos acuoso y EtOH/H₂O, respectivamente), y que retrasaban los fenómenos de pardeamiento en lonchas de patata de la misma variedad.

Palabras clave: perejil, polifenoles, pardeamiento patata, inhibición PPO, color

Abstract

Enzymatic browning is one of the main causes of organoleptic and nutritional spoilage in fruits and vegetables. Due to the current lifestyle, in recent years the consumption of fresh-cut products has grown. The susceptibility of these products for enzymatic browning is responsible for its short shelf life.

Nowadays the most commonly used additives for preventing enzymatic browning in minimally processed potato (MPP) are sulphites. Sulphites can cause allergic reactions to people suffering from asthma, besides diminishing the nutritional value and causing softening of the treated foods. Food industry needs to replace

sulphites with alternative compounds that delay enzymatic browning without causing the undesirable effects of sulphites.

Bearing in mind that the market prefers natural additives over synthetic additives, and knowing that parsley is rich in polyphenols and other antioxidant compounds, it is proposed to employ parsley extracts as antibrowning compounds in MPP.

Two types of extractions were carried out: an aqueous one and an EtOH/H₂O one. Both presented important antioxidant capacities and total polyphenol content. For the aqueous extract the values were 7,93 μmol TE/g parsley (dry weight) and 6,23 mg GAE/g parsley (dry weight), while for the EtOH/H₂O were 32,79 μmol TE/g parsley (dry weight) and 6,75 mg GAE/g parsley (dry weight). It was also observed that both extracts were effective inhibiting cv. *Monalisa* PPO activity (23,41 and 48,47% inhibitions for the aqueous and EtOH/H₂O extracts, respectively) and delaying browning phenomena in potato slices of the same variety.

key words: parsley, polyphenols, potato browning, PPO inhibition, color

Índice

1	Lista de figuras.....	iii
2	Lista de tablas.....	iii
3	Introducción.....	1
3.1	Pardeamiento enzimático: definición e implicaciones	1
3.1.1	Peroxidasa y lacasa.....	1
3.1.2	PPO: papel en el pardeamiento enzimático.....	1
3.1.3	Acción de las enzimas oxidantes.....	3
3.2	Evaluación del pardeamiento enzimático: calidad y vida útil.....	3
3.3	Pardeamiento en patata mínimamente procesada (PMP).....	4
3.4	Estrategias para la prevención del pardeamiento enzimático en PMP ..	5
3.4.1	Compuestos de origen natural como antipardeantes	7
4	Objetivos	8
5	Material y métodos.....	8
5.1	Material	8
5.2	Diseño experimental.....	9
5.3	Métodos de extracción	10
5.3.1	Extracto con agua.....	10
5.3.2	Extracto con EtOH/H ₂ O	10
5.4	Medición de la actividad antioxidante de los extractos.....	12
5.5	Medición de la cantidad de fenoles totales de los extractos.....	13
5.6	Determinación de la capacidad de los extractos para inhibir la PPO ..	14
5.7	Aplicación de los extractos en patata (<i>in vivo</i>)	17
5.7.1	Pruebas preliminares del seguimiento de la evolución del color ..	17
5.7.2	Seguimiento de la evolución del color con el Digieye	17
6	Resultados y discusión.....	19
6.1	Actividad antioxidante y cantidad de fenoles totales de los extractos ..	19
6.2	Capacidad de los extractos de perejil para inhibir la PPO de patata...	22
6.3	Aplicación de los extractos <i>in vivo</i> . Seguimiento con el Digieye	23
6.3.1	Luminosidad	23
6.3.2	Parámetro <i>a</i> *	24
6.3.3	Parámetro <i>b</i> *	25
6.3.4	Croma.....	26

6.3.5	<i>Hue</i> o tono	28
6.3.6	Diferencia total de color	29
6.3.7	Otros índices de color derivados	30
6.3.8	Discusión de la importancia de los parámetros estudiados	31
6.4	Propuesta de mejora del estudio.....	32
7	Conclusiones.....	33
8	Bibliografía	34
9	Anexo	39
9.1	Preparación de la recta patrón de Trolox	39
9.2	Preparación de la recta patrón de ácido gálico	39

1 Lista de figuras

Fig. 1 Esquema de las reacciones de condensación enzimáticas y no enzimáticas que dan lugar al pardeamiento. Extraído de Yoruk & Marshall (2003)	2
Fig. 2 Localización de los compuestos fenólicos y enzimas oxidantes (PPO y POD) en una célula vegetal típica. Extraído de Toivonen & Brummell (2008) ...	3
Fig. 3 Diseño experimental.....	9
Fig. 4 Filtrado a vacío	10
Fig. 5 Ultraturrax.....	11
Fig. 6 Ultrasonidos UP 400 Hielscher Ultrasound Technology	11
Fig. 7 Centrífuga Selecta Medifriger BL-S.....	11
Fig. 8 Rotavapor.....	12
Fig. 9 Espectrofotómetro Hitachi UH5300	13
Fig. 10 Centrífuga Sigma 3K30	15
Fig. 11 Distribución de los componentes para el cálculo del porcentaje de inhibición de la PPO de patata por parte de los extractos de perejil en una microplaca	16
Fig. 12 Espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Go.....	16
Fig. 13 Evolución de la luminosidad	24
Fig. 14 Evolución del parámetro a^*	25
Fig. 15 Evolución del parámetro b^*	26
Fig. 16 Evolución del croma	27
Fig. 17 Evolución del <i>hue</i>	28
Fig. 18 Evolución de la diferencia total de color	30
Fig. 19 Recta patrón de Trolox	39
Fig. 20 Recta de calibrado del ácido gálico	39
Fig. 21 Evolución de la absorbancia de la enzima PPO a 400 nm	40

2 Lista de tablas

Tabla 1 Reactivos y cantidades (μ l) para la reacción de la enzima PPO en una microplaca	15
Tabla 2 Resultados de actividad antioxidante y cantidad de fenoles totales (n=3)	19
Tabla 3 Actividad antioxidante y cantidad de fenoles totales en extractos acuosos de perejil (bibliografía)	20
Tabla 4 Porcentajes de inhibición de la PPO conseguidos con los extractos de perejil (n=4)	22
Tabla 5 Evolución de la diferencia total de color	29

3 Introducción

3.1 Pardeamiento enzimático: definición e implicaciones

El pardeamiento enzimático es una reacción responsable del deterioro de los alimentos a nivel organoléptico (afecta el color, el aroma, el sabor y la textura) y nutricional. Esto conlleva una menor aceptación del alimento por parte del consumidor, además de una reducción de la vida útil y del valor comercial del mismo (Ferreira Holderbaum, Kon, Kudo, & Pedro Guerra, 2010; Yoruk & Marshall, 2003).

Enzimas como la peroxidasa (POD) y la lacasa contribuyen a esta reacción, aunque la principal es la polifenoloxidasas o PPO (Carolina Dario Vitti, Fumi Sasaki, Miguel, Alfredo Kluge, & Luiz Moretti, 2011; Yoruk & Marshall, 2003). Se estima que por culpa de la PPO se ocasionan hasta el 50% de las pérdidas de frutas tropicales (Whitaker & Lee, 1995).

En algunos alimentos como las pasas negras, las ciruelas pasas, el zapote, el té, el café o el cacao el pardeamiento enzimático es deseable, ya que contribuye al desarrollo de colores y aromas característicos de estos productos (Whitaker & Lee, 1995; Yoruk & Marshall, 2003).

3.1.1 Peroxidasa y lacasa

La peroxidasa cataliza la pérdida de electrones de los compuestos fenólicos en presencia de peróxido de hidrógeno. Las células vegetales regulan con precisión la concentración de peróxido de hidrógeno en su interior con la finalidad de reducir al mínimo el considerable daño oxidativo que puede causar esta molécula. Teniendo en cuenta que el peróxido de hidrógeno se encuentra en muy baja concentración en las células vegetales, se estima que el papel de la POD en la oxidación de algunos fenoles se debe a un efecto sinérgico juntamente con las reacciones de pardeamiento enzimático causadas por la PPO (Cabezas Serrano, 2013; Toivonen & Brummell, 2008).

La lacasa es capaz de catalizar la oxidación de monofenoles, o-difenoles, p-difenoles, polifenoles, aminofenoles, metoxifenoles y otros complejos metálicos como el ferroceno (Goller, Peterbauer, Strauss, Galhaup, & Haltrich, 2002; Yoruk & Marshall, 2003).

3.1.2 PPO: papel en el pardeamiento enzimático

La PPO es un conjunto de enzimas que se encuentra presente en la mayoría de tejidos vegetales. El pardeamiento enzimático ocurre cuando la PPO, en presencia de oxígeno, cataliza la oxidación de compuestos fenólicos (concretamente monofenoles y o-difenoles) a o-quinonas (Yoruk & Marshall, 2003). La PPO tiene dos actividades enzimáticas: una hidroxilando monofenoles a difenoles (actividad monofenolasa o cresolasa) y otra oxidando difenoles a quinonas (actividad difenolasa o catecolasa) (Fig. 1).

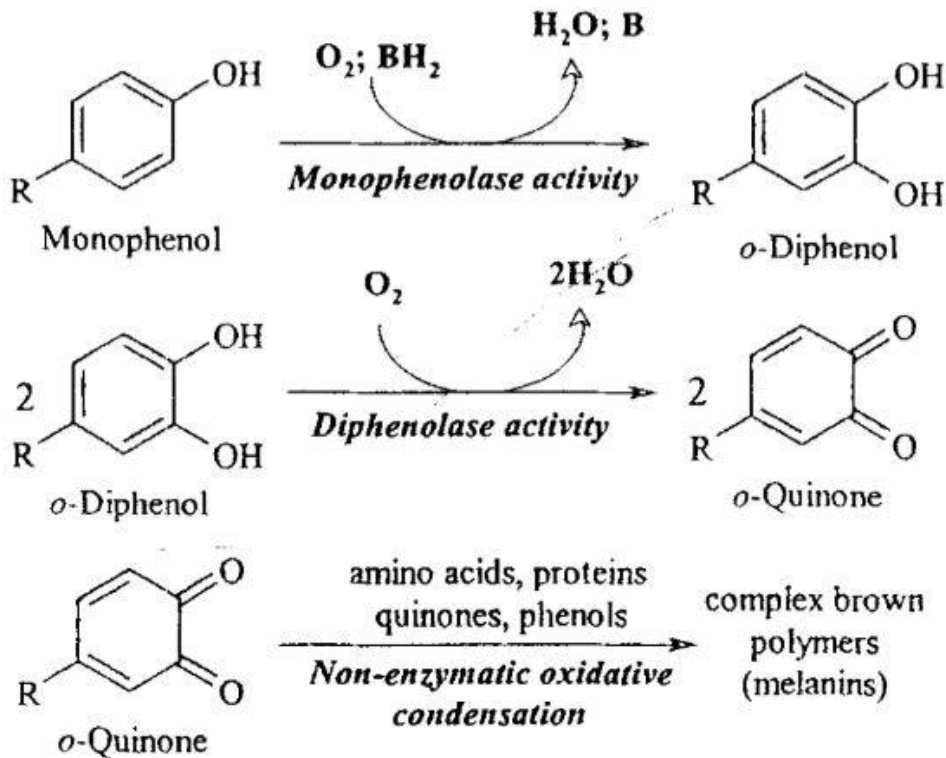


Fig. 1 Esquema de las reacciones de condensación enzimáticas y no enzimáticas que dan lugar al pardeamiento. Extraído de Yoruk & Marshall (2003)

A la actividad cresolasa siempre la sigue la actividad catecolasa, pero la actividad catecolasa no siempre viene precedida por la actividad cresolasa. Se han realizado estudios en los que una misma enzima presentaba actividad cresolasa en unos casos y no la presentaba en otros. Se cree que estas diferencias podrían deberse a la sensibilidad del método para detectarla; a un período de latencia de la actividad cresolasa, que depende de las condiciones del medio, o a los procedimientos de extracción y purificación, en los que se podría producir su inactivación (Yoruk & Marshall, 2003).

Las o-quinonas generadas mediante la reacción de la PPO con compuestos fenólicos tienen color propio. Sin embargo, el color típico del pardeamiento enzimático se debe principalmente a reacciones no enzimáticas de condensación de las o-quinonas con aminoácidos o proteínas para dar lugar a melaninas. Esta reacción de condensación conlleva un deterioro nutricional del alimento, ya que las o-quinonas reaccionan con las cadenas laterales de parte de los aminoácidos esenciales de la proteína, que pasan a no estar disponibles (Yoruk & Marshall, 2003).

Las patatas son una buena fuente de PPO y POD, y también contienen lacasa (Gacche, Ghole, Khobragade, & Sagar, 2002; Vernekar & Lele, 2009).

3.1.3 Acción de las enzimas oxidantes

En condiciones normales la PPO se encuentra dentro de los plastidios, por lo que no entra en contacto con el oxígeno ni con los compuestos fenólicos (que se encuentran principalmente en vacuolas y en la pared celular). La POD también se encuentra separada de los compuestos fenólicos y el oxígeno, ya que suele estar compartimentada en las mitocondrias, ribosomas o citoplasma (Toivonen & Brummell, 2008). En el caso de la lacasa ocurre lo mismo (Fig. 2).

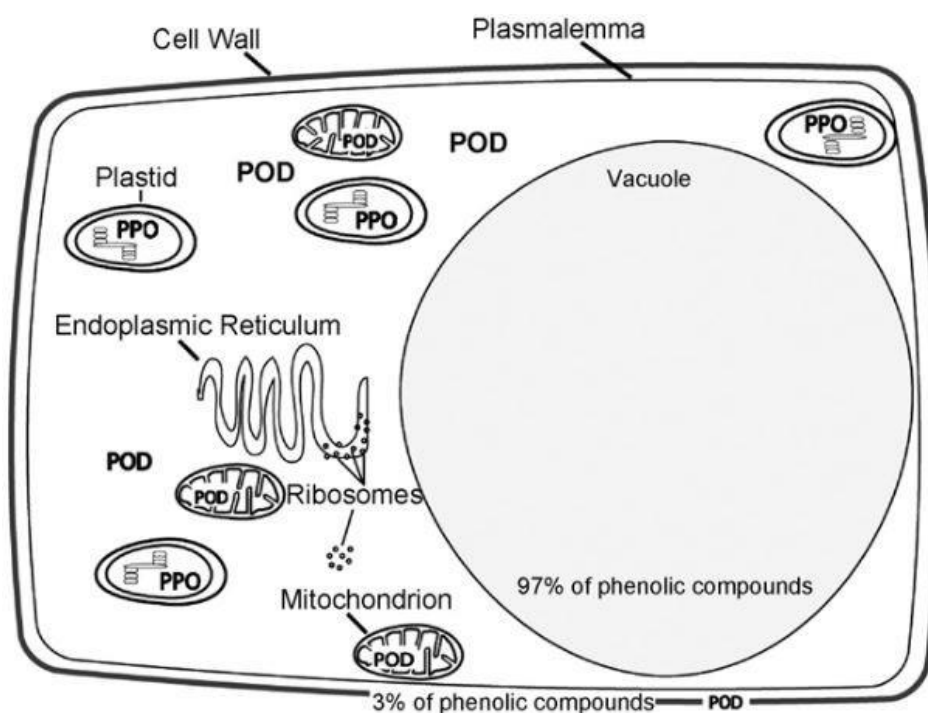


Fig. 2 Localización de los compuestos fenólicos y enzimas oxidantes (PPO y POD) en una célula vegetal típica. Extraído de Toivonen & Brummell (2008)

Es por eso que las patatas viejas, que han sido golpeadas o que tienen alguna enfermedad se pardean con mayor facilidad que el resto, ya que en estos casos la compartimentación celular empieza a fallar, y los sustratos fenólicos se mezclan con el oxígeno y las enzimas oxidantes. Aún lo hacen con mayor velocidad las patatas que han sido peladas y troceadas.

3.2 Evaluación del pardeamiento enzimático: calidad y vida útil

La calidad de frutas y vegetales mínimamente procesados depende de varios factores, entre los que se incluye la textura, el olor, el sabor, el valor nutricional y la apariencia visual. El deterioro de estos productos se hace evidente por su reblandecimiento; su deshidratación por pérdida de agua; cambios en el flavor debidos a la oxidación lipídica, pérdida de acidez e incremento del dulzor; crecimiento microbiano o cambios en su apariencia visual. Las técnicas que se aplican para intentar aumentar la vida útil de productos de IV gama tienen como objetivo minimizar estos cambios. Probablemente el factor más determinante a

la hora de comprar estos productos sea su color (Rico, Martín-Diana, Barat, & Barry-Ryan, 2007).

La medición del color puede realizarse de manera subjetiva u objetiva. La valoración subjetiva es más rápida y sencilla que la objetiva, pero los resultados obtenidos dependen de los observadores y del tipo y la cantidad de luz que iluminan el objeto que se estudia. Se pueden emplear cartas de color patrón como puntos de referencia.

La valoración objetiva se realiza por medio de instrumentos como espectrofotómetros y colorímetros, y se basa en la transmitancia o reflectancia de un haz de luz al incidir sobre el objeto (Arana, 2012). También es posible emplear sistemas de color por imagen digital como el Digieye.

Cada vez son más los consumidores que optan por consumir alimentos más naturales, y que valoran mejor los productos que contienen aditivos de origen natural que los que contienen aditivos sintéticos (Devcich, Pedersen, & Petrie, 2007; Garzón, 2017; Pérez, 2016; Vidal, 2015). En este contexto, resulta de especial interés encontrar conservantes de origen natural que permitan alargar la vida útil de los alimentos lo máximo posible. Entre estos conservantes se encuentran los agentes antipardeantes.

3.3 Pardeamiento en patata mínimamente procesada (PMP)

La PMP se considera un alimento de IV gama, puesto que su procesado se limita a operaciones como la selección, el lavado y desinfección, el pelado, el cortado, el envasado en atmósfera protectora y el almacenamiento en refrigeración.

Productos como la PMP presentan la limitación de su corta vida útil, debida a la acción de la PPO y otras enzimas oxidantes sobre sus componentes fenólicos. Los principales sustratos fenólicos de la patata son el ácido clorogénico, seguido del ácido cafeico, el ácido gálico y el ácido protocatecuico (Hou, Feng, Wei, & Wang, 2014).

La industria de la patata procesada en Europa movió un total de 9.4 billones de euros en 2015, lo que supone un 1.1% del valor de producción de toda la industria europea de alimentación y bebidas (Europatat, n.d.). Dada la importancia económica de esta industria es lógico que se investigue en estrategias para la prevención del pardeamiento en este producto.

Los productos más utilizados para evitar el pardeamiento enzimático y no enzimático en PMP son los sulfitos. Los sulfitos también son microbiostáticos y actúan como blanqueadores y agentes reductores, pero por otro lado deterioran el valor nutritivo de los alimentos, provocan reblandecimiento de los tejidos y aromas indeseables y pueden causar ataques asmáticos a las personas que sufren de esta enfermedad (Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria Nutrición, 2016; Laurila, Kervinen, & Ahvenainen, 1998). El uso de los aditivos E-220 a E-228 (dióxido de azufre, sulfitos y metabisulfitos) en frutas

y hortalizas peladas, cortadas y trituradas está limitado a 50 mg/kg (Diario Oficial de la Unión Europea, 2011).

3.4 Estrategias para la prevención del pardeamiento enzimático en PMP

A parte de la aplicación de sulfitos, existen otras estrategias para tratar de evitar el pardeamiento enzimático en PMP, de entre las cuales destacan las siguientes:

- Sustancias acidificantes. El objetivo es reducir el pH del medio todo lo posible para alejarse al máximo del pH óptimo de las enzimas oxidantes. El pH óptimo de la PPO de patata es de 6,6, y a un pH de 4 prácticamente no presenta ninguna actividad (Cho & Ahn, 1999).
- Agentes reductores, es decir, sustancias que se oxiden ellas mismas antes que los componentes fenólicos propios de la patata. Probablemente el agente reductor más empleado para evitar el pardeamiento en frutas y verduras sea el ácido ascórbico (Laurila et al., 1998), que además tiene acción acidificante.
- Inhibidores. Algunos ejemplos son el EDTA (o E-385), que crea complejos con el cobre presente en la PPO inhibiendo su actividad; la cisteína, que atrapa las o-quinonas; o el 4-hexyl-resorcinol (Cabezas Serrano, 2013; Whitaker & Lee, 1995).
- Atmosferas modificadas, para limitar la presencia de oxígeno y así reducir la acción de la PPO. También es posible envasar al vacío, consiguiendo una ausencia prácticamente total de oxígeno. Hay que tener en cuenta que la ausencia total de oxígeno puede llevar al metabolismo anaeróbico de la patata e inducir la formación de malos olores, además de facilitar el crecimiento de microorganismos patógenos como *Clostridium botulinum* (Tien, Vachon, Mateescu, & Lacroix, 2001).
- Recubrimientos comestibles en la superficie de la patata, como caseinato cálcico, proteínas del suero o Nature Seal 1020 (Baldwin, Nisperos, Chen, & Hagenmaier, 1996; Tien et al., 2001).
- Temperaturas de refrigeración, para reducir la velocidad de las enzimas oxidantes. La temperatura óptima de la PPO de patata es de 40°C, mientras que a 3°C la actividad de la misma enzima se reduce a aproximadamente la mitad (Cho & Ahn, 1999). Cabe tener en cuenta que el almacenamiento a temperaturas cercanas a 0°C puede causar daños por frío (Cabezas Serrano, 2013).
- Tratamientos de escaldado. Se ha demostrado que el blanqueamiento de lonchas de patata en soluciones salinas puede reducir el pardeamiento enzimático (Severini, Baiano, Pilli, Romaniello, & Derossi, 2003). La PPO de patata presenta una semivida a 70°C de 0.8 minutos (Cho & Ahn, 1999).
- Tratamientos de altas presiones. Se requiere la aplicación de presiones de 800-900 MPa para reducir la actividad de la PPO de patata (Hendrickx, Ludikhuyze, den Broeck, & Weemaes, 1998).

- Tratamientos con ultrasonidos, que aunque no están implementados a nivel industrial han demostrado reducir el pardeamiento enzimático en patata a nivel experimental (Caballero Anento, 2017).

Paralelamente, se pueden seleccionar las variedades de patata a utilizar en función de su susceptibilidad al pardeamiento enzimático. Por ejemplo, de mayor a menor susceptibilidad encontramos las variedades *Monalisa*, *Spunta*, *Liseta*, *Cara* y *Agria* (Cantos, Tudela, Gil, & Espín, 2002). Cabezas-Serrano et al. analizaron la susceptibilidad al pardeamiento de las variedades *Agata*, *Agria*, *Almera*, *Marabel* y *Vivaldi* en un primer trabajo, y de las variedades *Ariana*, *Liseta*, *Safrane* y *Spunta* en un estudio posterior. En el primer trabajo se observó que la variedad *Almera* era la más susceptible al pardeamiento, mientras que la incidencia de este problema era menor en las variedades *Vivaldi* y *Agria*, y se señaló las variedades *Marabel* y *Agata* como las más indicadas para ser procesadas como productos de IV gama (Cabezas-Serrano, Amodio, Cornacchia, Rinaldi, & Colelli, 2009). En el segundo experimento se observó que la variedad *Spunta* era la menos indicada para ser comercializada como producto de IV gama, mientras que las variedades *Liseta* y *Ariana* presentaron una susceptibilidad al pardeamiento intermedia, y la variedad *Safrane* fue la menos afectada por el pardeamiento. La susceptibilidad de una variedad de patata al pardeamiento viene dada principalmente por su contenido en antioxidantes y su actividad enzimática (Cornacchia, Cabezas-Serrano, Amodio, & Colelli, 2011).

Otra opción es la de la modificación genética. En el año 2001 Coetzer et al. ya desarrollaron patatas transgénicas con menor actividad de la PPO y menor pardeamiento enzimático, introduciendo ARN y ARN antisentido de la PPO de tomate en patatas de la variedad *Russeet Burbank* (Coetzer, Corsini, Love, Pavek, & Tumer, 2001).

El noviembre de 2014 el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos aprobó la plantación comercial de la patata *Innate*, producida por la empresa J.R. Simplot. El nombre de esta patata proviene del hecho que sólo contiene elementos génicos de cultivares patatas salvajes, pues se empleó el RNA de interferencia para crearla. Además de ser menos susceptible al pardeamiento enzimático, esta patata tiene un menor contenido de asparagina, precursor de la acrilamida, sustancia cancerígena que se forma al freír las patatas. En 2015 la Food and Drug Administration declaró que se trataba de un alimento de consumo seguro (Waltz, 2015).

Se ha demostrado que los tratamientos de CO₂ en estado supercrítico son útiles para reducir la actividad de las enzimas PPO y POD en zumos de manzana y zumos de remolacha (Marszałek, Kruszewski, Woźniak, & Skąpska, 2017; Marszałek, Krzyżanowska, Woźniak, & Skąpska, 2017). Este tipo de tratamiento no se ha probado sobre PMP, por lo que se podría definir una nueva línea de investigación en ese sentido.

3.4.1 Compuestos de origen natural como antipardeantes

Podemos encontrar multitud de plantas con concentraciones elevadas de compuestos con actividad antipardeante. Sin embargo, añadir esas plantas directamente a los alimentos no sería lo más eficaz, sino que primero habría que extraer sus compuestos de interés.

Existe un gran abanico de métodos de extracción. Por un lado tenemos las extracciones convencionales sólido-líquido y líquido-líquido. En estas extracciones se emplea un disolvente para extraer uno o varios compuestos de interés, de una mezcla líquida (líquido-líquido) o un sólido (sólido-líquido). Por otra parte, encontramos las técnicas de extracción modernas, cuyo uso se ha popularizado recientemente gracias a su mayor rendimiento, a pesar de su mayor complejidad y coste. Entre estas técnicas encontramos: la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción líquida a presión (PLE), la extracción asistida con microondas (MAE), la extracción asistida con ultrasonidos (UAE), la extracción asistida con campos de pulsos eléctricos (PEF) o con enzimas (EAE) (Azmir et al., 2013; Garcia Salas, Morales Soto, Segura Carretero, & Fernández Gutiérrez, 2010).

Hay una multitud de factores que pueden influenciar la composición de las extracciones realizadas, siendo algunos de los más importantes la composición del solvente, la temperatura, el tiempo, el ratio solvente-sólido, la presión o el tamaño de partícula (Michiels, Kevers, Pincemail, Defraigne, & Dommes, 2012). Las condiciones de almacenamiento del extracto hasta el momento del análisis también serán un factor determinante de su estabilidad frente a la degradación (Michiels et al., 2012).

El perejil es una planta que contiene concentraciones considerables de sustancias antipardeantes como las vitaminas C y E, la clorofila, diversos carotenoides, flavonas (apigenina, luteolina) y flavonoles (quercetina, kaempferol), la apiína, la malonilapiína o aceites esenciales como el apiol, la miristicina o el limoneno (Agyare, Appiah, Boakye, & Apenteng, 2017; Delgado Flores, 2015; Kuzma, Druzynska, & Obiedzinski, 2014; Luthria, Mukhopadhyay, & Kwansa, 2006; Marín, Sayas-Barberá, Viuda-Martos, Navarro, & Sendra, 2016; Stan, Soran, Varodi, & Lung, 2012). Dadas las características del perejil, en el presente trabajo se plantea estudiar la utilización de extractos de esta planta como antipardeante en PMP.

4 Objetivos

Objetivo general:

Extraer compuestos antipardeantes del perejil empleando distintas metodologías, cuantificar el contenido polifenólico de estos extractos y medir su potencial antipardeante tanto *in vitro* como *in vivo* en patata.

Objetivos específicos:

- Realizar extracciones de perejil probando distintos disolventes y métodos de extracción
- Determinar la capacidad antioxidante (inhibición del DPPH) y el contenido total de polifenoles (método de Folin-Ciocalteu) de los extractos de perejil preparados.
- Determinar el potencial de inhibición de los extractos de perejil preparados sobre la enzima PPO de patata cv. *Monalisa*.
- Aplicar los extractos de perejil obtenidos en lonchas de patata cv. *Monalisa* para determinar su potencial antipardeante *in vivo* y medir instrumentalmente los cambios de color que se dan en refrigeración a lo largo del tiempo.
- Evaluar si los extractos de perejil podrían constituir una alternativa natural al empleo de SO₂ en PMP.

5 Material y métodos

5.1 Material

Se emplearon los siguientes reactivos: etanol 99,89% (Oppac, Navarra, España), DPPH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), Trolox (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), ácido gálico (Panreac, Barcelona, España), reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza), carbonato de sodio anhidro (Panreac, Barcelona, España), ácido cítrico 1-hidrato (Panreac, Barcelona, España), disodio hidrógeno fosfato dihidratado (Panreac, Barcelona, España), NaCl (Panreac, Barcelona, España), PVPP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Las patatas cv. *Monalisa* se compraron en un supermercado local. El perejil fresco utilizado era de hoja lisa y también se compró en un supermercado local. Se determinó la humedad del perejil para poder expresar los datos sobre materia seca. La determinación se hizo en una balanza con cámara de desecación GRAM ST-H50. Se realizaron 3 repeticiones pesando cantidades de aproximadamente 1,6 g, y se obtuvo que la humedad total era de $84,75 \pm 1,94$ %.

5.2 Diseño experimental

Se hicieron extractos de perejil fresco usando dos métodos distintos de extracción. De cada extracto, se midió la capacidad antioxidante mediante el ensayo de DPPH y la cantidad de fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu.

Por otro lado, se determinó la capacidad de los extractos para inhibir la PPO de patata cv. *Monalisa*. Para ello, previamente se extrajo el enzima de la patata, la actividad de la cual se determinó espectrofotométricamente para comprobar que la extracción había sido correcta.

Por último, los extractos realizados se aplicaron *in vivo* en lonchas de patata cv. *Monalisa*, que se conservaron en refrigeración durante el estudio, y a las que se les monitorizó la evolución del color con el objetivo de cuantificar su grado de pardeamiento.

Para medir la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales se realizaron 3 repeticiones de cada tipo extracción, mientras que para determinar la capacidad de inhibición de la PPO de patata se realizaron otras 4 repeticiones de cada tipo de extracción. En el experimento *in vivo* la evolución del color se estudió sobre 5 lonchas de patata por tratamiento.

En la Fig. 3 se puede observar un esquema del diseño experimental.

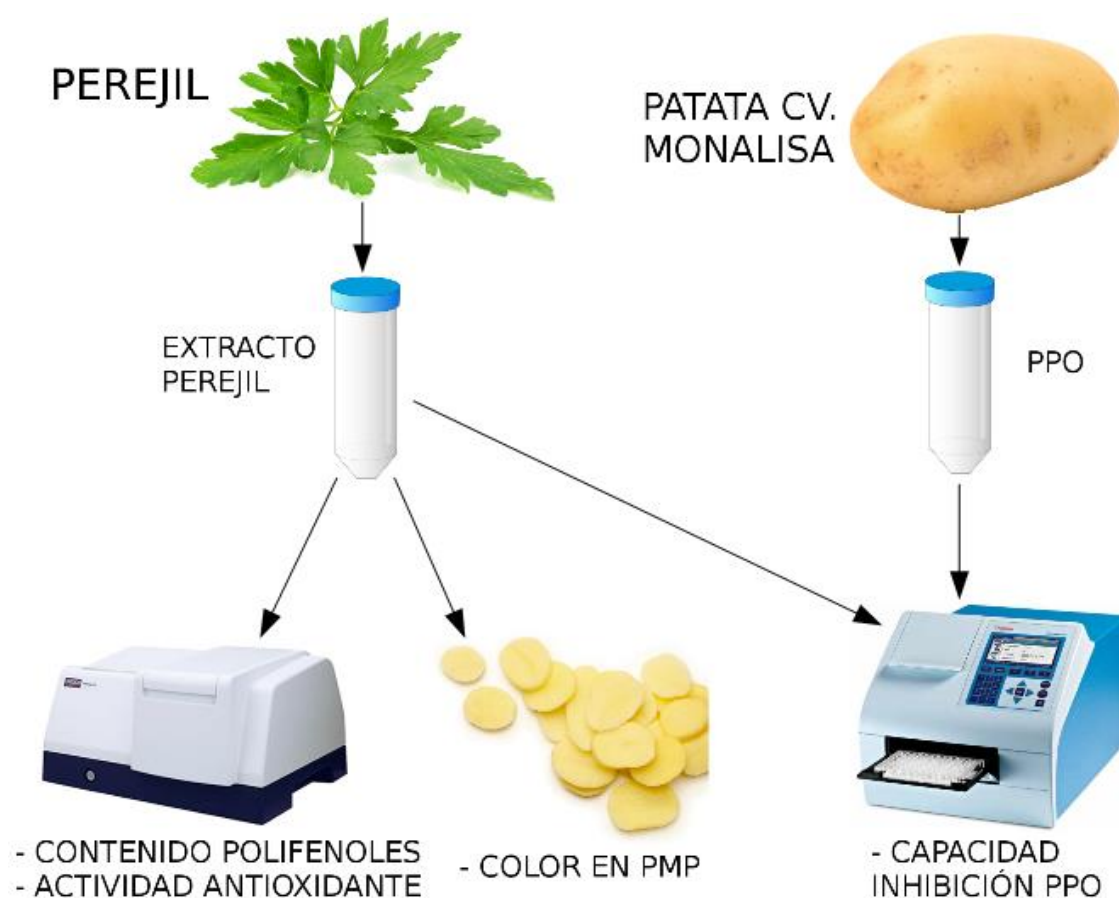


Fig. 3 Diseño experimental

5.3 Métodos de extracción

Se realizaron extracciones de perejil fresco utilizando dos métodos de extracción: en uno se empleaba como disolvente agua, y en el otro una disolución agua/etanol 50/50. La proporción disolvente/especie fue para ambos casos de 1/6, la misma que utilizó Bobo García (2014) en extractos acuosos de distintas especias.

En el caso de la extracción con agua/etanol, se decidió emplear una proporción 50/50 ya que Luthria et al. (2006) realizó extracciones de perejil utilizando agua/etanol en proporciones de 90/10, 70/30, 50/50, 30/70 y 10/90, y observó que el contenido de fenoles totales era muy superior cuando se empleaban las proporciones 70/30, 50/50 o 30/70 que en los otros dos casos.

5.3.1 Extracto con agua

Se calentaron 180 mL de agua destilada (tipo II) hasta 40°C con la ayuda de un calefactor Janke & Kunkel Ikamag RH S7. A ésta se le añadieron 30 g de perejil fresco previamente triturado hasta homogeneización con una picadora Kenwood Quad Blade Ice Crush de 450 W. Se mantuvo la temperatura constante a 40°C durante 15 minutos, midiéndola constantemente con un termómetro Hanna Chektemp 1. Pasado este período de tiempo, se separó el extracto (fracción acuosa) de la fracción sólida empleando una gasa de quesería. Seguidamente se volvió a filtrar el extracto a vacío (Fig. 4) empleando papel de filtro Whatman Nº 1.

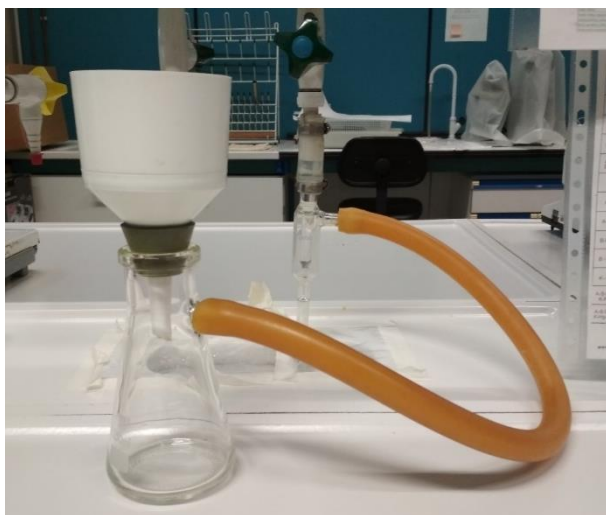


Fig. 4 Filtrado a vacío

5.3.2 Extracto con EtOH/H₂O

El método utilizado para la extracción con EtOH/H₂O se basó en el realizado por Cortéz Lainez (2017). Se prepararon 180 mL de disolución de agua destilada (tipo II)/etanol 50/50. La disolución se calentó hasta 40°C con la ayuda de un calefactor Janke & Kunkel Ikamag RH S7. A ésta se le añadieron 30 g de perejil

fresco previamente triturado hasta homogeneización con una picadora Kenwood Quad Blade Ice Crush de 450 W. Se mantuvo la temperatura constante a 40°C durante 15 minutos, midiéndola constantemente con un termómetro Hanna Chektemp 1.

Seguidamente se homogeneizó la mezcla con la ayuda de un Ultraturrax (Fig. 5), usándolo durante 2 minutos a 11000 rpm. A continuación se sometió la muestra a un segundo proceso de homogeneización mediante ultrasonidos. Se empleó para ello el equipo UP 400 Hielscher Ultrasound Technology (Fig. 6). Se realizaron 8 ciclos de 2 minutos al 100% de potencia, separados entre ellos por 1 minuto de descanso. En todo momento se mantuvo la muestra en hielo, para evitar un posible aumento de la temperatura. Después se dividió el extracto en 4 alícuotas que fueron centrifugadas a 4136 G durante 12 minutos a 5°C, usando el equipo Selecta Medifriger BL-S (Fig. 7).



Fig. 5 Ultraturrax

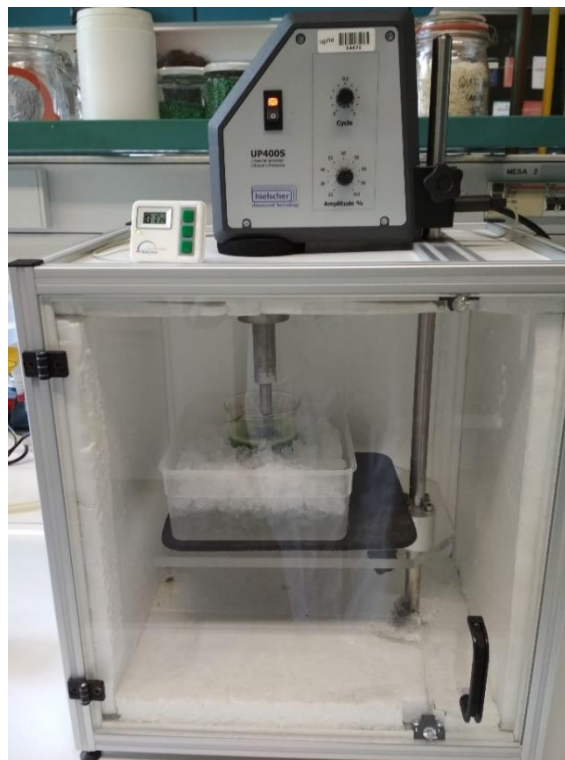


Fig. 6 Ultrasonidos UP 400 Hielscher Ultrasound Technology



Fig. 7 Centrifuga Selecta Medifriger BL-S

Una vez centrifugado, se recogió el sobrenadante en un matraz de fondo redondo de 500 mL. El extracto fue secado con rotavapor (Rotavapor Buchi R-200, acoplado a módulos de vacío V-805 y V-500 (Fig. 8)) hasta sequedad total. Se fijó la temperatura del baño a 35°C y la presión de vacío en 23 mbar. Se hizo circular agua fría para condensar los vapores. El extracto seco se resuspendió en 170 mL de agua destilada tipo II y se filtró a vacío empleando papel de filtro Whatman N° 1.

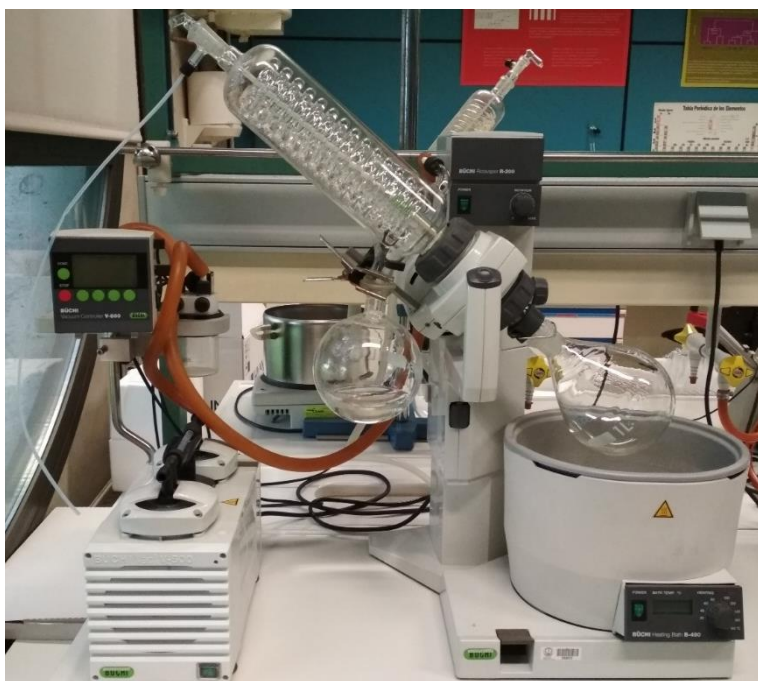


Fig. 8 Rotavapor

Si los extractos se iban a analizar en un período de 24 horas, se mantenían en refrigeración. En caso contrario, se congelaban a -25°C durante un período máximo de una semana.

5.4 Medición de la actividad antioxidante de los extractos

Para medir la actividad antioxidante se empleó el método del DPPH convencional utilizado por Bobo-García et al. (2015). El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) es un radical estable que presenta un color violeta oscuro, y que se vende de forma comercial. El ensayo se basa en la habilidad del antioxidante para reducir el DPPH, habilidad que puede ser medida por absorbancia.

En una cubeta de poliestireno se añadieron 2940 μL de solución de DPPH en metanol ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$) y 60 μL del extracto a analizar. Se midió la absorbancia de la mezcla a 515 nm al cabo de 1 hora de mezclar los reactivos en oscuridad con un espectrofotómetro Hitachi UH5300 (Fig. 9). El porcentaje de inhibición de los extractos se calculó mediante la Ecuación 1.

Ecuación 1:

$$\% \text{ inhibición DPPH} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} \right) \right] * 100$$

Donde A_{muestra} es la absorbancia a 515 nm de 2940 μL de solución de DPPH y 60 μL del extracto al cabo de 60 minutos, A_{blanco} es la absorbancia a 515 nm de 3000 μL de metanol, y A_{control} es la absorbancia a 515 nm de 2940 μL de solución de DPPH y 60 μL de agua destilada pasados 60 minutos.

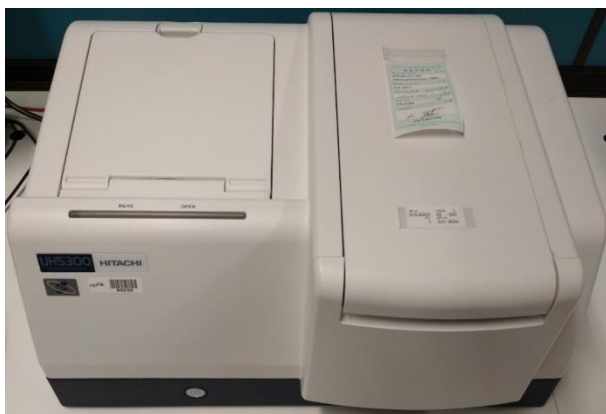


Fig. 9 Espectrofotómetro Hitachi UH5300

Los resultados se expresaron en μmol de equivalentes de Trolox/g de perejil (sobre ms), para ello siendo necesaria la preparación de una recta patrón (véase apartado 9.1). La expresión obtenida fue $y=0,0861x+0,5682$, donde y es el porcentaje de inhibición, e x es la concentración de Trolox en $\mu\text{mol/l}$.

Se realizó un test ANOVA para ver si existían diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del DPPH en función del tipo de extracción ($\alpha=0,05$). En caso de encontrar diferencias significativas se compararon mediante el test de Tukey. Para ello se empleó el programa SPSS Statistics en su versión 24.

5.5 Medición de la cantidad de fenoles totales de los extractos

El contenido fenólico total se determinó mediante el método Folin-Ciocalteu convencional (Bobo-García et al., 2015). En un matraz aforado de 100 mL se añadieron 50 mL de agua destilada tipo I, 1 mL del extracto a analizar y 5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reaccionar durante 5 minutos. Para completar la reacción, se añadieron 20 mL de una disolución de carbonato sódico (200 g L^{-1}) y se enrasó hasta el volumen final con agua destilada tipo I. Al cabo de 30 minutos a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de las muestras a 750 nm en un espectrofotómetro Hitachi UH5300. A la absorbancia de las muestras se le restó la absorbancia de la misma reacción pero con agua destilada en vez de extracto.

Se preparó una recta de calibrado (véase apartado 9.2) con la finalidad de expresar los resultados como mg de equivalentes de ácido gálico/g de perejil

(sobre ms). La expresión calculada fue $y=986,87x+0,0149$, donde y corresponde a la absorbancia menos la absorbancia del blanco, e x corresponde a la concentración de ácido gálico en g/ml.

Se realizó un test ANOVA para ver si existían diferencias significativas en la cantidad de fenoles totales en función del tipo de extracción ($\alpha=0,05$). En caso de encontrar diferencias significativas se compararon mediante el test de Tukey. También se estudió si existía relación lineal entre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales mediante la correlación de Spearman. Para ello se empleó el programa SPSS Statistics en su versión 24.

5.6 Determinación de la capacidad de los extractos para inhibir la PPO

Para determinar la capacidad que tenían los extractos de perejil para inhibir la PPO, previamente se tuvo que extraer la enzima de patatas (cv. *Monalisa*). Una vez extraída la PPO, se determinó su actividad para comprobar que la extracción había sido correcta. El resto de enzima se congeló a -25°C hasta su uso para determinar la capacidad inhibitoria. Antes de medir la capacidad inhibitoria de los extractos, se comprobaba que la actividad de la PPO no había sufrido ninguna variación importante.

Para obtener la enzima PPO de patata se siguió un procedimiento basado en el que empleó Bobo García (2014). En primer lugar, se preparó buffer McIlvaine ajustando el pH a 6,5. Se tomaron 50 ml de buffer en un vaso de precipitados, que se colocó en un recipiente con hielo para mantener la temperatura baja. Se añadieron al buffer 2,92 g de NaCl (1 M) y 5 % de PVPP, y la mezcla se mantuvo en agitación magnética hasta conseguir una disolución completa del NaCl y el PVPP.

Por otra parte se pelaron patatas cv. *Monalisa* y se cortaron a trozos muy pequeños. Se cogió una fracción de 25 g de trozos de patata y se añadió al buffer con NaCl y PVPP. Acto seguido la mezcla se pasó por el Ultraturrax a 11000 rpm hasta completa homogeneización. A continuación esta mezcla se filtró a vacío con papel de filtro Whatman N° 1 (siempre manteniéndola en frío). El filtrado se centrifugó a 25500 G durante 20 minutos a 4°C en una centrífuga Sigma 3K30 (Fig. 10). El sobrenadante, que contenía la enzima, se guardó en tubos Falcon de 15 ml a los que se les aplicó un barrido de N_2 , y que fueron almacenados a -25°C .



Fig. 10 Centrifuga Sigma 3K30

Para determinar la actividad de la PPO extraída se procedió de la siguiente manera: en primer lugar se preparó catecol 50 mM. El catecol y la PPO (previamente congelada) se atemperaron a 25°C. En una cubeta de polietileno de 1 cm, se añadieron 3 ml de catecol con 0,075 ml de enzima PPO, y acto seguido se midió la evolución de la absorbancia a 400 nm cada 5 s durante 2 minutos en un espectrofotómetro Hitachi UH5300. Como blanco de la reacción se empleó buffer McIlvaine (pH 6,5). Una unidad de actividad (UA) de PPO se definió como el cambio de la absorbancia en 0,001 unidades por minuto y mililitro inmediatamente después de la adición de la enzima. El cálculo de la actividad se hizo a partir de la zona lineal de la curva.

En la Fig. 21 se puede observar los valores de absorbancia medidos durante los 2 minutos. Se calculó que actividad de la PPO era de 515,56 UA/min*ml.

Para determinar la capacidad de inhibición de los extractos se procedió de la siguiente forma: en una microplaca (96 pocillos F/bottom; NUNC, Roskilde, Dinamarca) se dispusieron los reactivos descritos en la Tabla 1, tal como se puede ver en la Fig. 11. Para comenzar la reacción, primero se añadían el buffer McIlvaine (pH 6,5), el extracto de perejil y la enzima PPO diluida (1/2, v/v). Se introducía la microplaca en el espectrofotómetro y se agitaba durante 5 min a 25°C (velocidad media y continua) e incubaba otros 5 min a 25°C. Luego se añadía catecol 200 mM y se agitaba e incubaba otra vez durante 5 min cada una a 25°C.

Tabla 1 Reactivos y cantidades (μ l) para la reacción de la enzima PPO en una microplaca

Descripción	B. McIlvaine	E. perejil	PPO	Catecol
A	120	0	40	40
B	160	0	0	40
C	80	40	40	40
D	120	40	0	40
Blanco	200	0	0	0

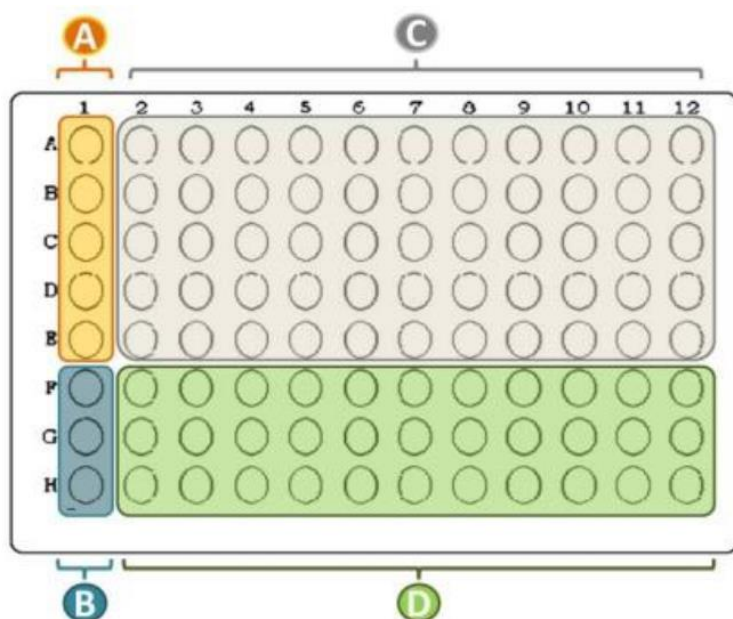


Fig. 11 Distribución de los componentes para el cálculo del porcentaje de inhibición de la PPO de patata por parte de los extractos de perejil en una microplaca

Las medidas se realizaron a 420 nm en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Go (Fig. 12). A la absorbancia obtenida se le restó la absorbancia del blanco para determinar la capacidad de los extractos para inhibir la PPO (Ecuación 2).

Ecuación 2:

$$\% \text{ inhibición PPO} = \left[\left(\frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \right) * 100 \right]$$

Donde A corresponde a la absorbancia obtenida por la reacción de la PPO sin la presencia de un extracto de perejil; B es el blanco de las medidas de A; C corresponde a la absorbancia obtenida por la reacción de la PPO en presencia del extracto de perejil a estudiar; y D es el blanco de las medidas de C.



Fig. 12 Espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Go

Antes de medir la capacidad de inhibición de los extractos, se realizaba una determinación de la actividad de la PPO que se iba a emplear para asegurarse de que no existieran grandes diferencias de actividad entre esa misma PPO y la PPO se empleó para determinar la actividad inicial de la enzima.

Se realizó un test ANOVA para ver si existían diferencias significativas en los porcentajes de inhibición calculados en función del tipo de extracción ($\alpha=0,05$). En caso de encontrar diferencias significativas se compararon mediante el test de Tukey. Para ello se empleó el programa SPSS Statistics en su versión 24.

5.7 Aplicación de los extractos en patata (*in vivo*)

5.7.1 Pruebas preliminares del seguimiento de la evolución del color

Se sumergieron varias lonchas de patata cv. *Monalisa* de aproximadamente 1 cm de grosor en distintos baños a 20°C durante un tiempo de 7 minutos:

- Uno de agua destilada (control)
- Uno con una disolución 50/50 de la extracción acuosa
- Uno con una disolución 50/50 de la extracción EtOH/H₂O

Una vez pasados los 7 minutos, las lonchas se sacaron del baño, se escurrieron y se pusieron en bolsas de polietileno transparentes a las que seguidamente se les extrajo el 20% del aire, se sellaron y se almacenaron a 4°C. Se hizo un seguimiento visual de la evolución del color de las lonchas de patata a lo largo de 25 días. Se observó que las patatas control presentaban un grado de pardeamiento muy superior a las patatas a las que se les había aplicado los extractos de perejil acuoso y EtOH/H₂O. Para poder caracterizar con mayor precisión estas diferencias, se realizó un segundo experimento.

5.7.2 Seguimiento de la evolución del color con el Digieye

Se volvieron a preparar los extractos descritos en los apartados 5.3.1 y 5.3.2, y se aplicaron en lonchas de patata nuevamente tal y como se hizo en el apartado 5.7.1. La diferencia respecto al primer experimento es que después de sacar del baño y escurrir las lonchas de patata, éstas se almacenaron en 3 bolsas de polietileno de tipo zip (una para las lonchas control, otra para las de la extracción acuosa y otra para las de la extracción EtOH/H₂O). Justo después de aplicar los baños, y durante varios días después (concretamente 1, 3, 7, 9, 11 y 14 días después de aplicar el baño) se tomaron fotografías de las distintas lonchas de patata con el equipo Digieye. Se empleó el iluminante estándar D65 con una apertura de 8 mm. Se estudiaron un total de 5 lonchas por tratamiento, y cada loncha se fotografió siempre por los dos lados. Cuando no se estaban fotografiando las lonchas de patata, éstas se mantenían almacenadas en una cámara frigorífica a 4°C. El empleo de bolsas tipo zip permitió realizar mediciones de color correctamente minimizando la deshidratación de las patatas.

Posteriormente, con el software Digieye en su versión 2.80, se recortó el área correspondiente a cada loncha de patata fotografiada (por un lado y por el otro). De cada recorte, se calcularon los valores promedio del espacio CIELAB (L^* , a^* y b^*). Esta forma de trabajar permitió obtener una medida más representativa del color de las lonchas de patata, pues éste no era perfectamente homogéneo en todas las zonas de las lonchas.

Se realizó un test ANOVA para ver si existían diferencias significativas en los parámetros de color analizados en función del día y el tratamiento aplicado ($\alpha=0,05$). En caso de encontrar diferencias significativas se compararon mediante el test de Tukey. Para ello se empleó el programa SPSS Statistics en su versión 24.

6 Resultados y discusión

6.1 Actividad antioxidante y cantidad de fenoles totales de los extractos

Los resultados de actividad antioxidante y cantidad de fenoles totales obtenidos se muestran en la Tabla 2. Las extracciones con EtOH/H₂O permitieron obtener una mayor actividad antioxidante (diferencias estadísticamente significativas, p-valor=0,014), pero no una mayor cantidad de fenoles totales (p-valor=0,454).

Tabla 2 Resultados de actividad antioxidante y cantidad de fenoles totales (n=3)

Parámetro analizado	Tipo extracción	Resultado
Act. antioxidante	H ₂ O	17,91 ± 8,05 ^a
- % inhibición DPPH	EtOH/H ₂ O	72,27 ± 21,16 ^b
Act. antioxidante	H ₂ O	7,93 ± 3,67 ^a
- μmol TE/g perejil (sobre ms)	EtOH/H ₂ O	32,79 ± 9,64 ^b
Cant. fenoles totales	H ₂ O	6,23 ± 0,85 ^c
- mg GAE/g perejil (sobre ms)	EtOH/H ₂ O	6,75 ± 0,85 ^c

Diferentes letras indican diferencias significativas entre los 2 tipos de extracción en el parámetro analizado

Aparentemente se esperaría que si el extracto EtOH/H₂O tiene mayor actividad antioxidante, su contenido fenólico fuera mayor. Sin embargo, su cantidad de fenoles totales no difiere estadísticamente de la del extracto acuoso. Ello podría indicar que en el extracto de perejil hubiera más compuestos con actividad antioxidante aparte de los fenoles.

El coeficiente de correlación de Spearman entre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales fue positivo pero de valor muy pequeño, sólo 0,257. No se pudo demostrar si las variables estaban correlacionadas significativamente (sig. bilateral=0,623), probablemente debido al reducido número de muestras.

Otros autores también han estudiado el contenido polifenólico y la actividad antioxidante de extractos acuosos de perejil. Sus resultados se resumen en la Tabla 3.

A excepción de la actividad antioxidante del extracto realizado a 90°C, los resultados que obtuvo Merino Antón (2017) son aparentemente inferiores a los obtenidos en el estudio presente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los resultados obtenidos por este autor son difícilmente comparables con los de este estudio, ya que el autor expresó los resultados sobre g de perejil fresco, y el contenido de humedad del perejil fresco suele ser muy superior al del perejil seco (por ejemplo, el perejil fresco empleado en el estudio presente tenía un 84,75% de humedad, y el perejil seco que empleó Al-Juhaimi & Ghafoor (2011) tenía un 8,5% de humedad). Es por ello que se esperaría que el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante calculados por Merino Antón (2017)

en perejil fresco fueran muy superiores si estos valores se hubieran expresado sobre g de perejil seco o sobre g de materia seca. También hay que tener en cuenta que en el estudio de Merino Antón (2017) se utilizó una proporción perejil/agua de 1/10, mientras que en el actual se utilizó una proporción 1/6, lo que presentando resultados en base seca podría suponer obtener mayores valores de capacidad antioxidante y contenido fenólico en el primer caso, pero si expresáramos la concentración en base a ml de extracto, probablemente las diferencias serían mucho menores. Comentar que resulta interesante ver que al aumentar la temperatura de extracción la actividad antioxidante aumentó mucho, pero sin embargo la cantidad de fenoles totales se redujo.

Además de trabajar con perejil fresco, Merino Antón (2017) repitió los mismos extractos empleando perejil seco, expresando los resultados sobre g de perejil seco. En estas muestras se observan unos contenidos de fenoles totales algo más próximos al obtenido en el estudio actual, pero unas actividades antioxidantes superiores. Aunque no se conoce con claridad, podría ser que el proceso de secado tuviera un efecto sobre el contenido de fenoles totales y/o la actividad antioxidante.

Tabla 3 Actividad antioxidante y cantidad de fenoles totales en extractos acuosos de perejil (bibliografía)

Condiciones	Fenoles totales mg GAE/g	Act. antioxidante	Referencia
Perejil fresco extraído a 40 y 90°C (datos sobre g de perejil fresco)	4,43 (40°C) 3,70 (90°C)	3,79 $\mu\text{mol TE/g}$ 21,10 $\mu\text{mol TE/g}$	(Merino Antón, 2017)
Perejil seco extraído a 40 y 90°C (datos sobre g de perejil seco)	8,14 (40°C) 6,78 (90°C)	17,37 $\mu\text{mol TE/g}$ 16,64 $\mu\text{mol TE/g}$	(Merino Antón, 2017)
Perejil tratado con vapor 1,5 min y secado al microondas a vacío (datos sobre ms)	16,51	11,98% inhib. DPPH	(Priecina & Karlina, 2013)
Hojas secas, 30 y 60 min en agitación (datos sobre ms)	4,57 (30 min) 4,74 (60 min)	12,84% inhib. DPPH 13,82% inhib. DPPH	(Kuzma et al., 2014)
Hojas frescas y hojas frescas calentadas en microondas 1, 2 y 3 min (datos sobre g de perejil seco)	10,31 (0 min) 13,72 (1 min) 2,83 (2 min) 2,05 (3 min)	40,10% inhib. DPPH 51,83% inhib. DPPH 36,89% inhib. DPPH 24,78% inhib. DPPH	(Sahar M., 2014)

En comparación con los resultados del estudio presente, tanto Priecina & Karlina (2013) como Kuzma et al. (2014) obtuvieron actividades antioxidantes inferiores, y Kuzma et al. (2014) también obtuvo un contenido de fenoles totales inferior. Sahar M. (2014) obtuvo una cantidad de fenoles totales superior a la observada en el presente estudio en los extractos sin calentar y calentado 1 minuto. Sin embargo, en los extractos calentados durante 2 y 3 minutos, la concentración de fenoles totales fue muy menor, menor incluso que la del presente estudio. Las actividades antioxidantes fueron en todos los casos superiores a la del presente estudio, pero se observó una gran disminución en el extracto calentado 3 minutos.

Cabe decir que las diferencias que se observan entre estudios podrían ser debidas a que se hayan empleado distintas variedades de perejil y/o a las condiciones de cultivo del mismo.

Al-Juhaimi & Ghafoor (2011) realizaron extractos de hojas de perejil seco triturado (8,5% humedad) con dietil éter, y obtuvieron un porcentaje de inhibición de DPPH del 30,35 % y un contenido de fenoles totales de 12,2 mg GAE/g perejil seco. Cabe comentar que el empleo de un disolvente como el dietil éter, mucho más polar que el agua y el etanol (Murov, n.d.), podría suponer un mayor grado de extracción de polifenoles y/o la extracción de distintos compuestos. Curiosamente, el porcentaje de inhibición de DPPH calculado por estos autores se enmarca dentro del rango obtenido en el presente estudio, pero el contenido de fenoles totales es superior. Hay que decir que los porcentajes de inhibición son difícilmente comparables, ya que además de utilizarse solventes distintos, en el presente estudio se utilizó una proporción perejil/disolvente de 1/6, mientras que en el estudio de Al-Juhaimi y Ghafoor esta proporción fue 1/10 (muy inferior).

Marín et al. (2016) estudiaron la cantidad de polifenoles y la actividad antioxidante de aceite esencial de perejil ecológico comercial. Obtuvieron un nivel de fenoles totales de 0,34 mg GAE/ml de aceite esencial, y actividades antioxidantes de 28,87, 44,22, 53,34 y 64,28 % para diluciones del aceite esencial de 5, 10, 20 y 50 g/l.

Como conclusión se puede decir que, aunque se observa un importante grado de variabilidad respecto otros trabajos en los que también se ha estudiado el perejil, los extractos de esta planta poseen una concentración de fenoles totales y una actividad antioxidante considerables, lo que significa que pueden ser buenos antipardeantes para aplicar en PMP.

Sin embargo hay que tener en cuenta que un antioxidante concreto puede, en determinados casos, actuar mediante varios mecanismos en un mismo sistema (Ishige, Schubert, & Sagara, 2001), y que los antioxidantes pueden responder de distinta forma a diferentes radicales o agentes oxidantes (Prior, Wu, & Schaich, 2005). De hecho, se ha visto que hay extractos de plantas que son inhibidores

de la PPO de patata y al mismo tiempo favorecen la acción de la PPO de seta (Kuijpers et al., 2014). Así pues, no existe un método universal para determinar la capacidad antioxidante.

Según Prior et al. (2005), los ensayos para medir la capacidad antioxidante se pueden clasificar según el mecanismo de la reacción en la que se basan, habiendo los siguientes tipos:

- Transferencia de átomos de hidrógeno (*Hydrogen Atom Transfer*, HAT). Se mide la habilidad del antioxidante para frenar los radicales libres cediendo un hidrógeno. Suelen ser reacciones rápidas.
- Transferencia de electrones (*Single Electron Transfer*, SET). Se mide la habilidad para ceder un electrón para reducir un compuesto. Suelen ser reacciones lentas.

Los mecanismos HAT y SET casi siempre ocurren de forma simultánea en una muestra. El método del DPPH se considera un método SET, aunque de forma marginal también se pueden dar reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno.

Merece especial mención el método de Folin-Ciocalteu, que aunque es conocido como un método para medir la cantidad de fenoles de una muestra, se basa en una reacción redox, por lo que podría considerarse como otro método para medir la actividad antioxidante (Prior et al., 2005).

6.2 Capacidad de los extractos de perejil para inhibir la PPO de patata

Se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición en función del tipo de extracción (p-valor=0,027). Los resultados se muestran en la Tabla 4. Se ve claramente como el extracto EtOH/H₂O tiene un potencial de inhibición de la PPO muy superior.

Tabla 4 Porcentajes de inhibición de la PPO conseguidos con los extractos de perejil (n=4)

Tipo de extracción	% inhibición PPO de patata
H ₂ O	23,41 ± 4,94 ^a
EtOH/H ₂ O	48,47 ± 16,50 ^b

Diferentes letras indican diferencias significativas el % de inhibición entre los 2 tipos de extracción

Merino Antón (2017) también estudió la inhibición de la PPO de patata empleando extractos de perejil. En su experimento empleó una dilución de la PPO en microplaca de 1/9, en vez de 1/2, como en el estudio presente. Como inhibidores utilizó diluciones del 80% de extractos acuosos de perejil obtenidos a 40 y 90°C, y obtuvo unos porcentajes de inhibición de 34,50 ± 16,00 y 60,82 ± 16,92, respectivamente. Ciertamente se trata de valores de inhibición

superiores al obtenido, y los extractos que empleó estaban diluidos, pero también hay que tener en cuenta que el hecho de utilizar PPO diluida a una proporción 1/9 (mucho menos concentrada) hace que sea mucho más fácil causar su inhibición.

6.3 Aplicación de los extractos *in vivo*. Seguimiento con el Digieye

A partir de los recortes de las fotos de lonchas de patata, se calcularon los valores promedio del espacio CIELAB (L^* , a^* y b^*). En general se considera que un tratamiento antipardeante es bueno si consigue que los parámetros de color del alimento no varíen o varíen lo mínimo posible durante el almacenamiento. Así, se considerarán mejoras antipardeantes aquellos agentes con los que se consiga ΔL , Δa^* e Δb^* menores. A continuación se presentan los valores promedio de L^* , a^* , b^* y otros parámetros empleados para medir el color.

6.3.1 Luminosidad

L^* (0-100) corresponde a la luminosidad, que tomará valores altos si el color es muy claro, y valores pequeños si es muy oscuro (Konica Minolta, n.d.). En la Fig. 13 se puede observar la evolución de la luminosidad.

El día 0 las lonchas de patata mostraron valores promedio de luminosidad de entre 87,18 (EtOH/H₂O) y 88,15 (control). Se detectaron diferencias significativas entre las lonchas control y las tratadas con una solución EtOH/H₂O, lo que indicaría que la aplicación solución EtOH/H₂O afecta la luminosidad inicial de las lonchas de patata.

En el día 1 la luminosidad de las lonchas control se redujo significativamente hasta un valor promedio de 85,2. En cambio, para las lonchas tratadas con H₂O y con EtOH/H₂O la luminosidad aumentó significativamente hasta valores promedio de 88,81 y 87,80, respectivamente.

El día 3 la luminosidad de todas las lonchas de patata se redujo significativamente respecto al día 1. El día 7 la luminosidad de las lonchas tratadas con H₂O y con EtOH/H₂O se mantuvo prácticamente constante. En cuanto al tratamiento control, la luminosidad se redujo aunque no de forma significativa.

Durante los días posteriores la luminosidad de todas las patatas continuó reduciéndose de forma gradual, al excepción de en el tratamiento con EtOH/H₂O, en el que se observó un pequeño repunte del día 9 al día 11. Las luminosidades de las patatas tratadas con EtOH/H₂O y con H₂O fueron significativamente superiores a la luminosidad de las patatas control en sus respectivos días hasta los días 11 y 14, respectivamente.

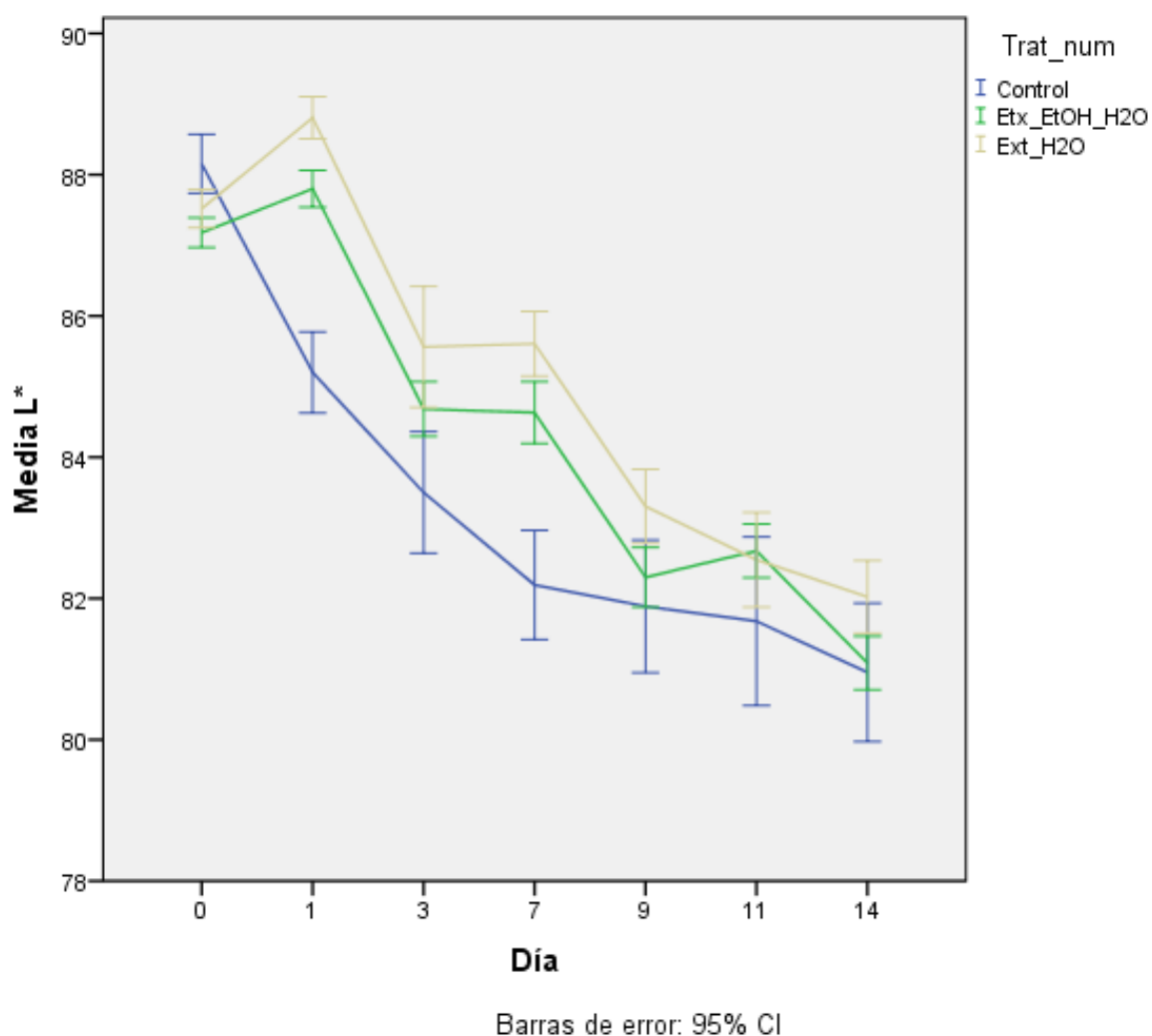


Fig. 13 Evolución de la luminosidad

6.3.2 Parámetro a^*

El parámetro a^* toma valores positivos para colores rojos, y valores negativos para colores verdes (Konica Minolta, n.d.). En la Fig. 14 se puede observar la evolución del parámetro a^* .

El día de la aplicación del baño las lonchas de patata control presentaron un valor a^* promedio de 2,10, mientras que las tratadas con extracciones con EtOH/H₂O y con H₂O mostraron valores de 1,81 y 1,12, respectivamente. Hubo diferencias significativas entre el valor a^* del control y las tratadas con la extracción EtOH/H₂O. No se observaron diferencias significativas entre el tratamiento control y el tratamiento con EtOH/H₂O ese día, pero sí durante los días 1, 3, 5 y 7.

En todos los tratamientos el valor a^* incrementó a lo largo del tiempo, a excepción del día 1, que se pudo observar una disminución, aunque no significativa, en el tratamiento con extracción acuosa. El valor promedio de las

muestras control siempre fue el más elevado, seguido de las muestras tratadas con EtOH/H₂O y por último las tratadas con H₂O.

El día 14 el valor de a^* para las muestras tratadas con EtOH/H₂O era muy cercano al de las muestras control, mientras que las muestras tratadas con H₂O seguían manteniendo diferencias significativas con el control.

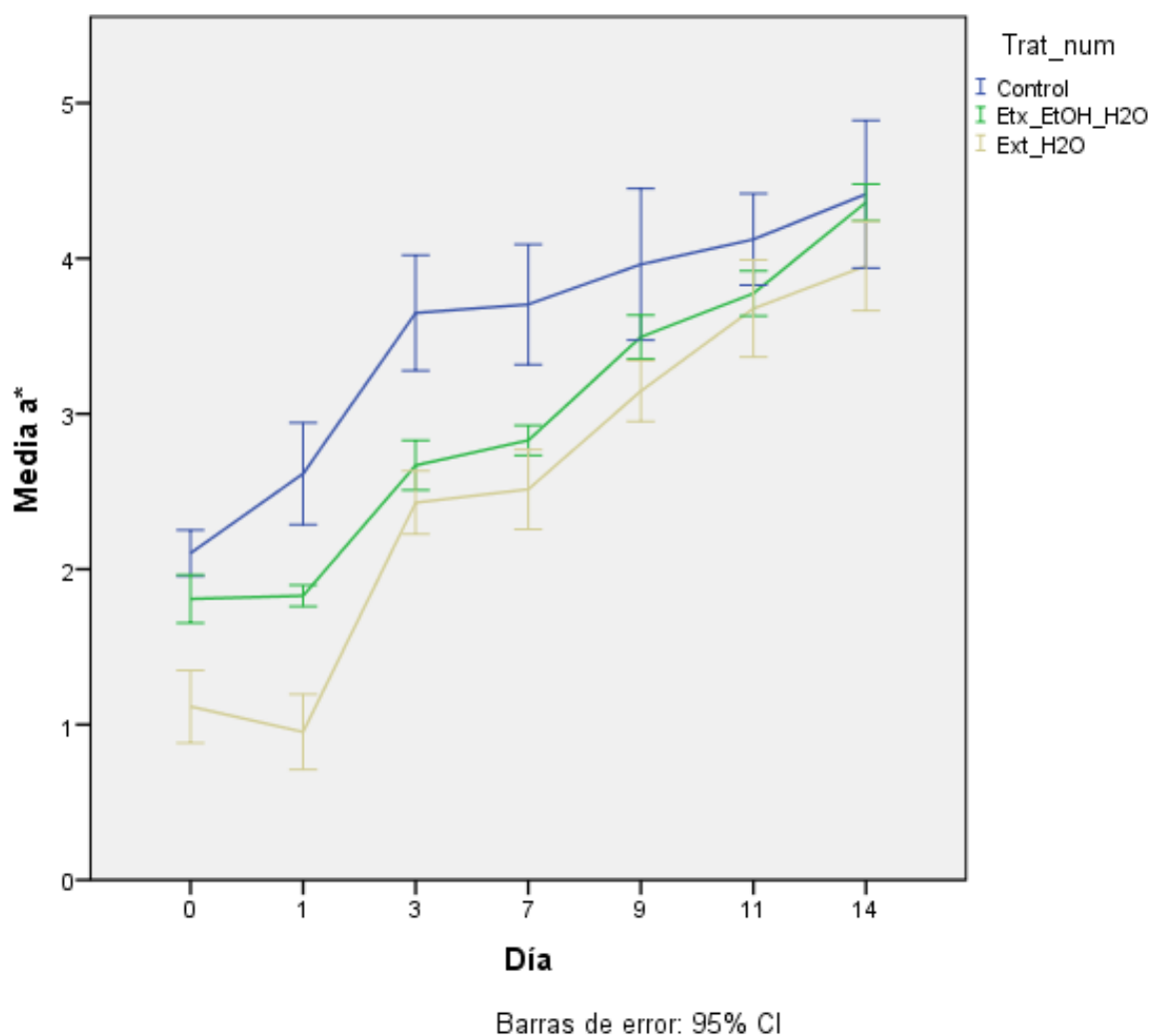


Fig. 14 Evolución del parámetro a^*

6.3.3 Parámetro b^*

Valores positivos del parámetro b^* indican colores amarillos, y valores negativos del mismo parámetro indican colores azules (Konica Minolta, n.d.). En la Fig. 15 se puede observar la evolución del parámetro b^* .

Lo primero que destaca a día 0 es que la muestra control presenta un valor de b^* muy superior a las otras dos muestras. El primer día, el valor de b^* disminuye mucho para todos los tratamientos, pero sobretodo para el control, tanto que las tres muestras presentan valores de b^* estadísticamente iguales.

El día 3 se pueden observar de nuevo disminuciones significativas en todos los tratamientos respecto el día 1. En los días 7 y posteriores, la muestra control y la tratada con el extracto acuoso muestran valores de b^* prácticamente constantes. En el caso de la muestra tratada con el extracto EtOH/H₂O, sí se observa una ligera disminución.

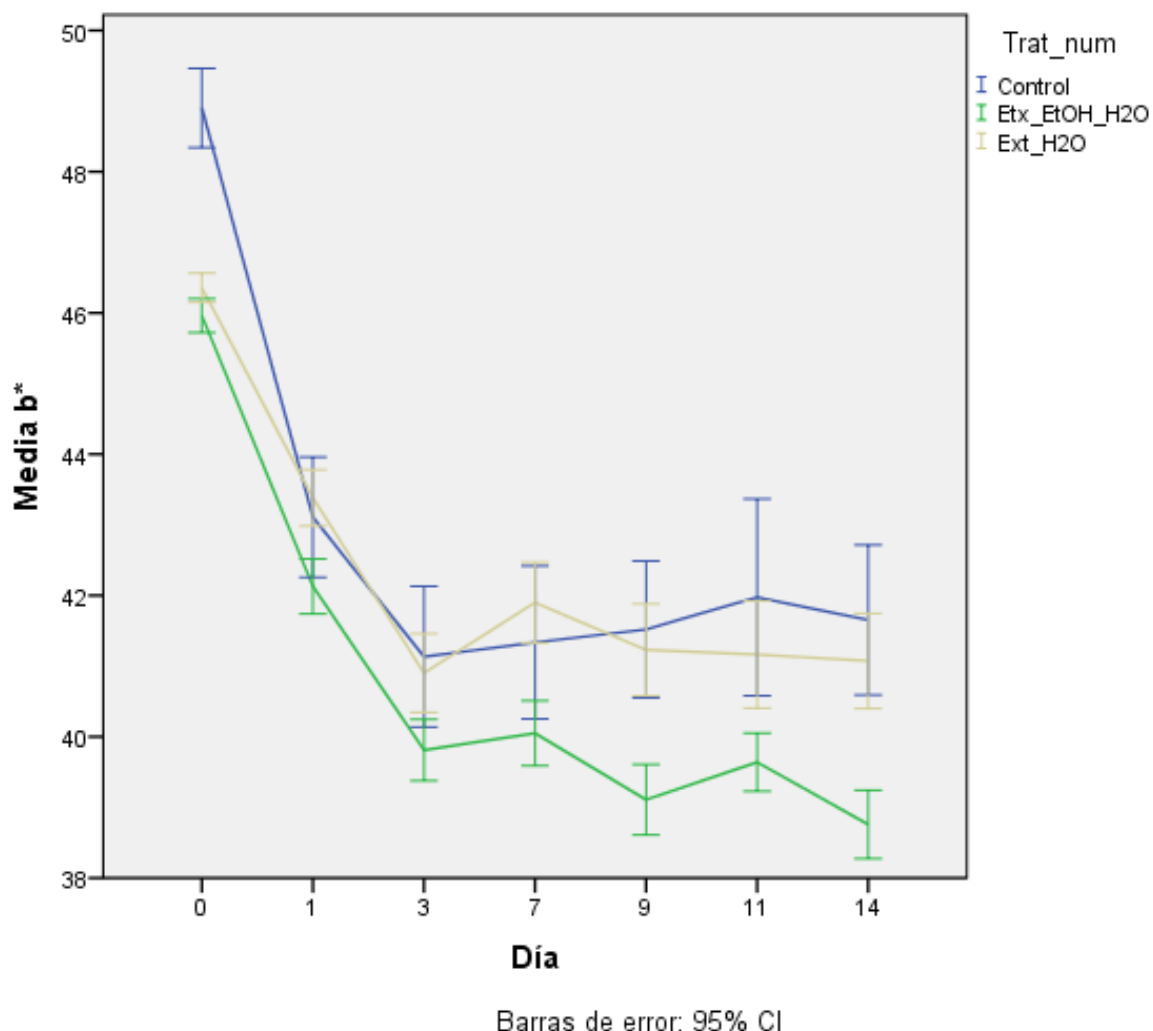


Fig. 15 Evolución del parámetro b^*

Se calculó también el croma, el tono o *hue* y la diferencia total de color, así como otros índices de color derivados.

6.3.4 Croma

El croma (C^*) se considera el atributo cuantitativo de un color. Cuanto mayor sea su valor, mayor es la intensidad percibida (Pathare, Opara, & Al-Said, 2013). El croma se calcula mediante la Ecuación 3.

Ecuación 3:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

Como se puede observar en la Fig. 16, el tratamiento control presentó un croma inicial estadísticamente superior al de las muestras tratadas con extractos. El día 1 el croma de todas las muestras se redujo, siendo la muestra control la que presentó mayor reducción, hasta el punto de no presentar diferencias significativas con las otras dos muestras. En el día 3 se observó también cierta reducción del croma en todos los casos. En los días 7 y posteriores el croma del control y del extracto acuoso se mantuvieron prácticamente constantes, mientras que el croma del extracto EtOH/H₂O se redujo ligeramente.

Como conclusión, se podría decir que las patatas mínimamente procesadas pierden gran parte de la intensidad del color inicial al cabo de 1 día de su procesado, y la pierden casi toda a los 3 días del procesado, independientemente del extracto aplicado. La aplicación de cualquiera de los extractos reduce la intensidad de color inicial.

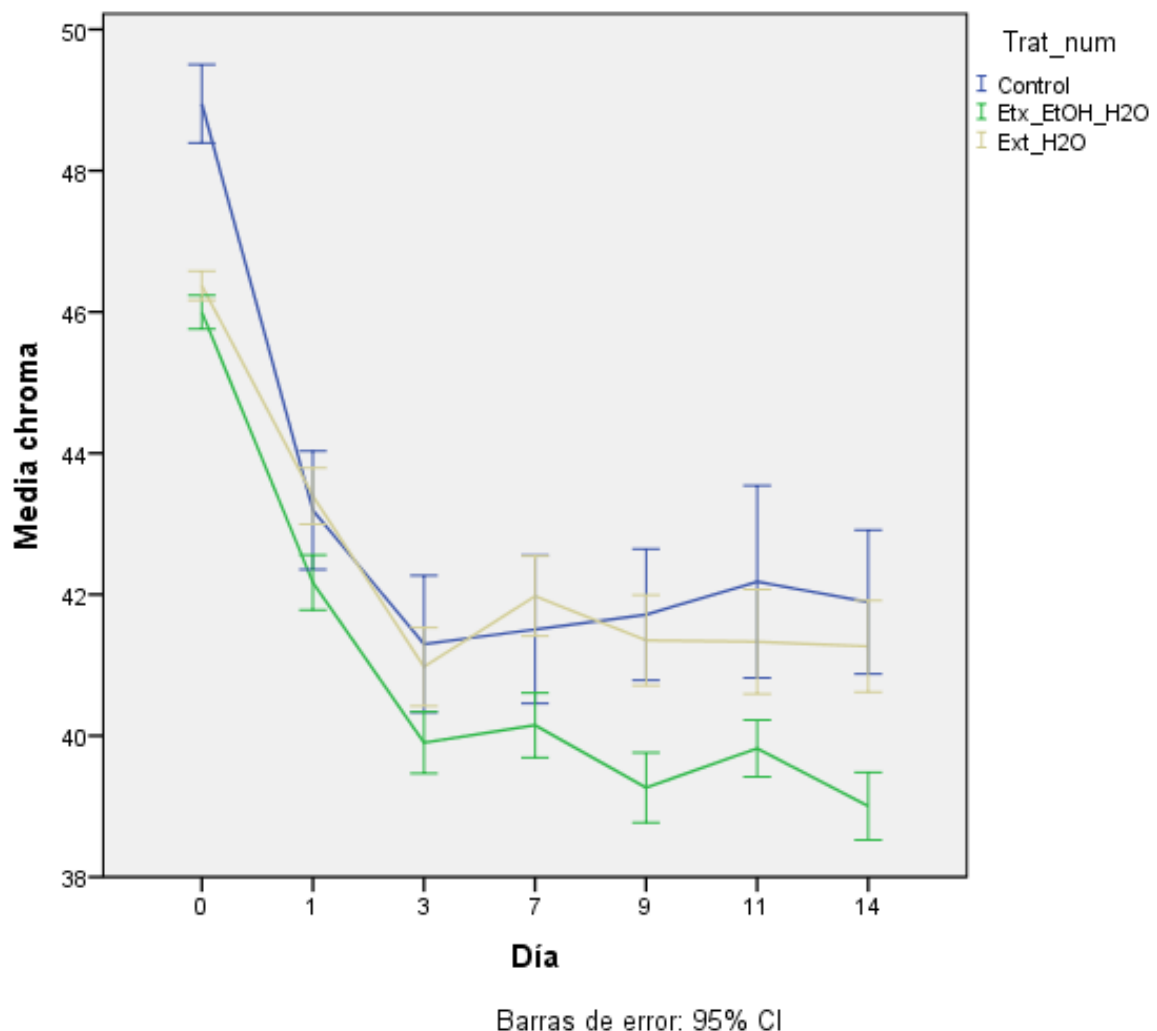


Fig. 16 Evolución del croma

6.3.5 Hue o tono

El *hue* se considera el atributo cualitativo de un color. Un ángulo de 0° representa un *hue* rojo, mientras que uno de 90° representa un *hue* amarillo (Pathare et al., 2013). El *hue* se calcula mediante la Ecuación 4:

Ecuación 4:

$$hue = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

Como se puede observar en la Fig. 17, tanto el *hue* de las lonchas de patata control como el de las lonchas tratadas con extractos se vio reducido a medida que pasaba el tiempo. Cabe comentar que las lonchas tratadas con extracto acuoso presentaron un *hue* inicial estadísticamente superior, y que las lonchas control presentaron una reducción del *hue* muy drásticas entre los días 0 y 3.

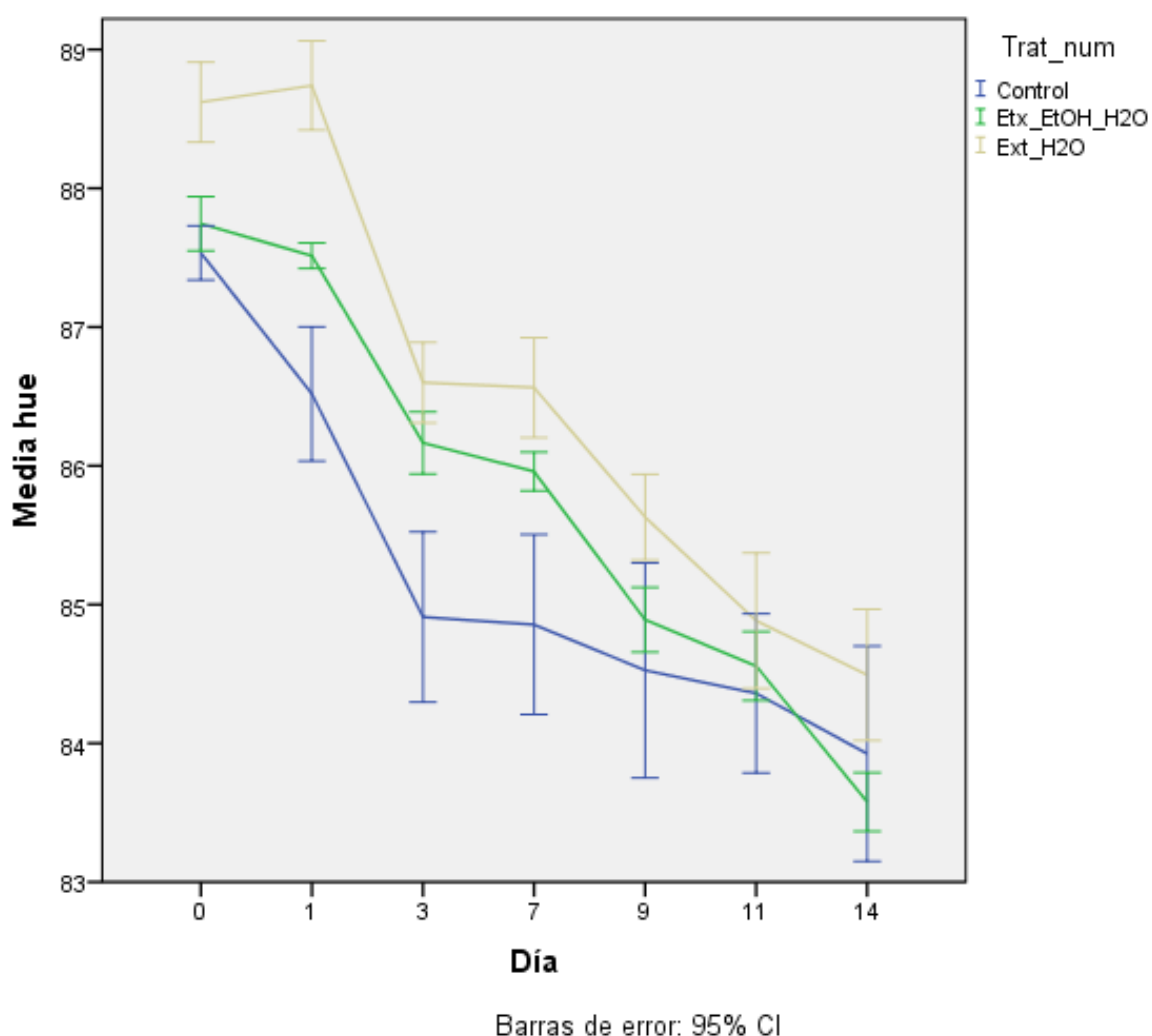


Fig. 17 Evolución del *hue*

6.3.6 Diferencia total de color

La diferencia total de color ΔE^* se puede calcular de acuerdo a la Ecuación 5, en la que se mide la diferencia entre los valores a^* , b^* y L^* en el momento deseado y esos mismos valores al inicio del experimento.

Ecuación 5:

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta a^{*2} + \Delta b^{*2} + \Delta L^{*2}}$$

De acuerdo con Limbo & Piergiovanni (2006), las diferencias de color se pueden clasificar de acuerdo a la siguiente escala:

- $\Delta E^* < 0,2$: diferencia no perceptible
- $0,2 < \Delta E^* < 0,5$: diferencia muy pequeña
- $2 < \Delta E^* < 3$: diferencia apenas perceptible
- $3 < \Delta E^* < 6$: diferencia perceptible
- $6 < \Delta E^* < 12$: diferencia fuerte
- $\Delta E^* > 12$: diferentes colores

En la Tabla 5 y en la Fig. 18 se puede observar cómo evoluciona la diferencia total de color con el tiempo. En el caso del control, se observa una diferencia fuerte de color ya en el primer día. Al tercer día esta diferencia aumenta significativamente, pero a partir de ahí se mantiene constante.

En el caso de los extractos, también se observan aumentos significativos de la diferencia de color en los días 1 (diferencia perceptible) y 3 (diferencia fuerte) respecto al principio del experimento. A partir del día 7 y hasta el final también aumentan las diferencias, aunque no siempre de forma significativa.

Debe tenerse en cuenta que el color inicial de las patatas de los distintos tratamientos no era el mismo, lo que afecta a este parámetro.

Tabla 5 Evolución de la diferencia total de color

Día	Control	Ext. H ₂ O	Ext. EtOH/H ₂ O
0	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
1	6,58 ± 1,32 ^b	3,35 ± 0,50 ^b	3,91 ± 0,74 ^b
3	9,23 ± 1,70 ^c	6,02 ± 0,98 ^c	6,70 ± 0,73 ^c
7	9,78 ± 1,38 ^c	5,10 ± 1,04 ^c	6,54 ± 0,91 ^c
9	9,89 ± 2,58 ^c	6,97 ± 2,17 ^{cd}	8,60 ± 0,73 ^d
11	9,72 ± 2,17 ^c	7,65 ± 1,59 ^{cd}	8,02 ± 0,68 ^d
14	10,50 ± 2,54 ^c	8,15 ± 1,26 ^d	9,78 ± 0,96 ^e

Por columnas, diferentes letras indican diferencias significativas en la diferencia total de color entre distintos días.

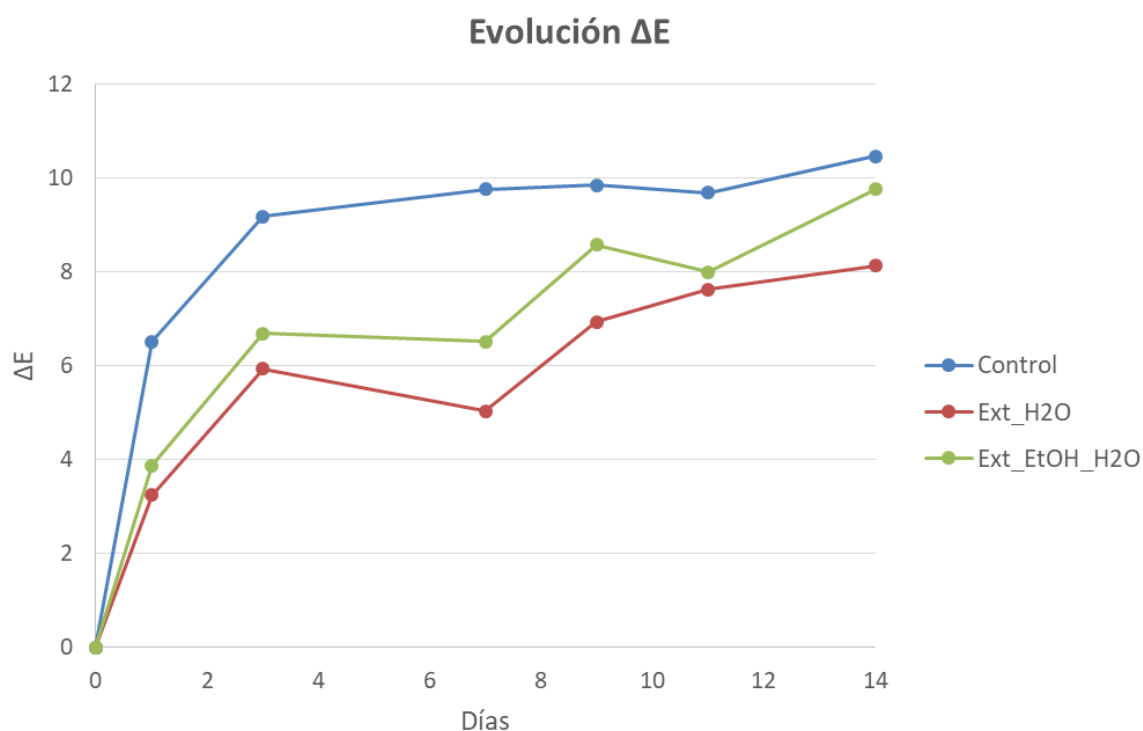


Fig. 18 Evolución de la diferencia total de color

6.3.7 Otros índices de color derivados

Se calcularon otros índices de color derivados de los parámetros del espacio CIELAB (L^* , a^* y b^*) (resultados no mostrados). Estos parámetros fueron:

- **White Index** (Ecuación 6): es un indicador del nivel de blanco. Angós Iturgaiz (2008) empleó este parámetro al estudiar la influencia de atmosferas modificadas en el color de patata mínimamente procesada

Ecuación 6:

$$WI = \sqrt{(100 - L^{*2}) + a^{*2} + b^{*2}}$$

- **Browning index** (Ecuación 7): Ali, El-Gizawy, El-Bassiouny, & Saleh (2016) emplearon este indicador para medir el pardeamiento enzimático en patata. A mayor valor, mayor pardeamiento. Para comparar los resultados entre distintos días, los autores calculaban el % de incremento de BI respecto al BI inicial.

Ecuación 7:

$$BI = [100 * (X - 0,31)]/0,172$$

$$\text{donde } X = (a^* + 1,75 * L^*) / (5,645 * L^* + a^* - 3,012 * b^*)$$

$$\text{aumento \% BI} = [(BI_x - BI_0) / BI_0] * 100$$

Al calcular los % de incremento de BI en el estudio presente, se observó que no tenían sentido, ya que en todos los casos el BI inicial era mayor que observado los días posteriores, obteniéndose un ΔBI negativo.

- **Yellowness index** (Ecuación 8): se relaciona con la degradación que sufren los productos por la luz, exposición a agentes químicos y procesado (Pathare et al., 2013). A mayor valor, mayor degradación.

Ecuación 8:

$$YI = \frac{142,86 * b^*}{L^*}$$

- **L*/b**: O'Leary, Gormley, Butler & Shilton (2000) usaron este índice para estudiar el efecto de la congelación en puré de patata.

6.3.8 Discusión de la importancia de los parámetros estudiados

En todos los parámetros analizados se refleja que la aplicación de extractos de perejil (bien sean acuosos o EtOH/H₂O) en PMP es útil para retrasar los fenómenos que causan el pardeamiento.

Tal y como se ha visto, existen muchos parámetros que permiten ver la evolución del color en PMP a medida que tienen lugar las reacciones de pardeamiento. Sin embargo, algunos parámetros pueden indicar con mayor precisión que otros en qué estado se encuentra el producto.

Los parámetros L^* , a^* y *hue* mostraron cambios bastante graduales a lo largo del experimento, lo que los convierte en parámetros útiles para determinar en qué fase se encuentra el producto analizado, y para distinguir de forma objetiva un producto recién cortado de otro que presente cierto grado de pardeamiento.

Los parámetros b^* , croma, ΔE^* , *WI* y *YI* también presentaron cambios a lo largo del experimento, pero estos se dieron mayoritariamente los días 1 y 3, y a partir de entonces los valores de cada parámetro se mantenían prácticamente invariables.

Angós Iturgaiz (2008) investigó el empleo de atmosferas modificadas en el color de patata mínimamente procesada. Además de medir el color de forma instrumental, realizó catas con un panel que evaluaba el grado de pardeamiento. Los parámetros que estudió fueron: L^* , a^* , b^* , *WI*, croma, *hue* y ΔE^* . Los únicos parámetros de color que se correlacionaron significativamente con la apariencia visual del pardeamiento por un panel de cata fueron el *WI*, el *hue*, L^* y a^* , siendo los dos últimos los que mejor predecían la apreciación visual del panel de cata.

Resulta interesante ver que de los 4 parámetros de color instrumental que Angós Iturgaiz (2008) relacionó con la apariencia visual de pardeamiento, 3 (L^* , a^* y

hue) coinciden con los parámetros que en el estudio presente se ha visto que mejor permiten seguir la evolución del pardeamiento.

6.4 Propuesta de mejora del estudio

En este apartado simplemente se listan tres ideas que se podrían haber llevado a cabo para obtener un trabajo más completo.

- Se podría haber realizado un test organoléptico de PMP control y PMP tratada con los 2 extractos de perejil, para determinar hasta qué punto en el tiempo el aspecto de la PMP es aceptada por el consumidor (la patata se va pardeando con el tiempo).

La información obtenida en este mismo test podría ser correlacionada con la información obtenida en el experimento con el Digieye, con la finalidad de conocer a partir de qué valores de L^* , a^* , b^* u otros parámetros de color la PMP ya no sería aceptada por los consumidores.

- Otra sugerencia de mejora del estudio sería preparar otro test organoléptico y dar a probar patata cocinada, sin tratar y tratada con los 2 extractos de perejil, con la finalidad de detectar si la aplicación de alguno de los extractos puede influir en el sabor y/o aroma de la patata.

- La última propuesta sería la de estudiar instrumentalmente la evolución del color de lonchas de patata mínimamente procesada a las que se les haya aplicado un baño con una solución de 50 ppm de SO_2 (concentración máxima aplicable de forma legal en hortalizas peladas y cortadas).

7 Conclusiones

De los resultados de este trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Los extractos de perejil presentan una importante actividad antioxidante *in vitro* y un considerable contenido de fenoles. El extracto acuoso puede causar una inhibición del DPPH del 17,91%, lo que equivale a $7,93 \mu\text{mol TE/g}$ perejil (sobre ms), y presenta un contenido total de polifenoles de 6,23 mg GAE/g perejil (sobre ms). Para el extracto EtOH/H₂O estos valores son de 72,27%, equivalentes a $32,79 \mu\text{mol TE/g}$ perejil (sobre ms), y 6,75 mg GAE/g perejil (sobre ms).
2. El extracto de perejil acuoso es capaz de causar una inhibición de la PPO de patata del 23,41%, mientras que el extracto EtOH/H₂O inhibe esta enzima hasta en un 48,47%.
3. La aplicación de extractos de perejil (bien sean acuosos o EtOH/H₂O) en PMP cv. *Monalisa* es útil para retrasar los fenómenos que causan el pardeamiento.
4. Los parámetros de color instrumental L^* , a^* y tono son los que mejor permiten seguir la evolución del pardeamiento en PMP cv. *Monalisa*, así como distinguir PMP recién cortada de PMP con un avanzado grado de pardeamiento.
5. La aplicación de extractos de perejil sobre PMP cv. *Monalisa* modifica su color inicial: ambos extractos reducen el valor de b^* , y el extracto EtOH/H₂O reduce también los valores de L^* y a^* .
6. El empleo de extractos de perejil puede ser una alternativa parcial e incluso total a la aplicación de SO₂ en PMP, siempre acompañado de almacenamiento en refrigeración.

8 Bibliografía

- Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria Nutrición. (2016). Reevaluación de los aditivos del grupo anhídrido sulfuroso y sulfitos por la autoridad europea de seguridad alimentaria (EFSA). Retrieved from http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/sulfitos_rev1.pdf
- Agyare, C., Appiah, T., Boakye, Y. D., & Apenteng, J. A. (2017). *Petroselinum crispum*: a Review. In *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 527–547). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00025-X>
- Al-Juhaimi, F., & Ghafoor, K. (2011). Total phenols and antioxidant activities of leaf and stem extracts from coriander, mint and parsley grown in Saudi Arabia. *Pak . J . Bot*, 43(4), 2235–2237.
- Ali, H. M., El-Gizawy, A. M., El-Bassiouny, R. E. I., & Saleh, M. A. (2016). The role of various amino acids in enzymatic browning process in potato tubers, and identifying the browning products. *Food Chemistry*, 192, 879–885. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.100>
- Angós Iturgaiz, I. Á. (2008). *Empleo de atmósferas ricas en CO₂ y altas concentraciones de O₂ en la mejora de las características de calidad de patata mínimamente procesada del cv. "Monalisa" almacenada en refrigeración*. Universidad Pública de Navarra.
- Arana, I. (2012). *Physical Properties of Foods*. Boca Raton: CRC Press.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <http://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2013.01.014>
- Baldwin, E. A., Nisperos, M. O., Chen, X., & Hagenmaier, R. D. (1996). Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology*, 9(2), 151–163. [http://doi.org/10.1016/S0925-5214\(96\)00044-0](http://doi.org/10.1016/S0925-5214(96)00044-0)
- Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín-Arroyo, M. R., & Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <http://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Bobo García, G. (2014). *Estudio de estrategias para la conservación de patatas (cv. Monalisa) mínimamente procesadas*. Universidad Pública de Navarra.
- Caballero Anento, A. (2017). *Efecte dels ultrasons i solucions àcides en l'enfosquiment enzimàtic de la patata (Solanum Tuberosum)*. Universitat Politècnica de Catalunya. Retrieved from <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/107335/memoria.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cabezas-Serrano, A. B., Amodio, M. L., Cornacchia, R., Rinaldi, R., & Colelli, G. (2009). Suitability of five different potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) to be processed as fresh-cut products. *Postharvest Biology and Technology*,

- 53(3), 138–144. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.03.009>
- Cabezas Serrano, A. B. (2013). *Estrategias dirigidas a retrasar el pardeamiento enzimático en productos destinados a la IV Gama: alcachofas y patatas*. Universidad de Córdoba. Retrieved from <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/9760/2013000000729.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cantos, E., Tudela, J. A., Gil, M. I., & Espín, J. C. (2002). Phenolic Compounds and Related Enzymes Are Not Rate-Limiting in Browning Development of Fresh-Cut Potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3015–3023. <http://doi.org/10.1021/jf0116350>
- Carolina Dario Vitti, M., Fumi Sasaki, F., Miguel, P., Alfredo Kluge, R., & Luiz Moretti, C. (2011). Activity of Enzymes Associated with the Enzymatic Browning of Minimally Processed Potatoes. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 54(5), 983–990.
- Cho, Y. K., & Ahn, H. K. (1999). Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. Purification and properties. *Journal of Food Biochemistry*, 23(6), 577–592. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1999.tb00587.x>
- Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavek, J., & Tumer, N. (2001). Control of Enzymatic Browning in Potato (*Solanum tuberosum* L.) by Sense and Antisense RNA from Tomato Polyphenol Oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 652–657. <http://doi.org/10.1021/jf001217f>
- Cornacchia, R., Cabezas-Serrano, A. B., Amodio, M. L., & Colelli, G. (2011). Suitability of 4 Potato Cultivars (*Solanum tuberosum* L.) to be Processed as Fresh-Cut Product. Early Cultivars. *American Journal of Potato Research*, 88(5), 403. <http://doi.org/10.1007/s12230-011-9206-3>
- Cortéz Lainez, N. (2017). *Estudio y evaluación de la extracción de compuestos fenólicos del hinojo marino (Crithmum maritimum)*. Universidad Pública de Navarra.
- Delgado Flores, M. L. (2015). *Caracterización y cuantificación de flavonoides en dos especies de Petroselinum con diferentes tratamientos térmicos*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/11335/1/1080215469.pdf>
- Devcich, D. A., Pedersen, I. K., & Petrie, K. J. (2007). You eat what you are: Modern health worries and the acceptance of natural and synthetic additives in functional foods. *Appetite*, 48(3), 333–337. <http://doi.org/10.1016/j.appet.2006.09.014>
- Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión (2011). Retrieved from <https://www.boe.es/doue/2011/295/L00001-00177.pdf>
- Europatat. (n.d.). The EU potato sector: statistics on production and trade. Retrieved January 4, 2018, from <http://europatat.eu/activities/the-eu-potato-sector/>
- Ferreira Holderbaum, D., Kon, T., Kudo, T., & Pedro Guerra, M. (2010). Enzymatic Browning, Polyphenol Oxidase Activity, and Polyphenols in Four

- Apple Cultivars: Dynamics during Fruit Development. *HortScience*, 45(8), 1150–1154.
- Gacche, R. N., Ghole, V. S., Khobragade, C. N., & Sagar, A. D. (2002). Potato Phenol Oxidases Immobilized s-Triazine Containing Dialdehyde: An Efficient Biocatalysts For Bioremediation of Phenols. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 61, 621–624.
- Garcia Salas, P., Morales Soto, A., Segura Carretero, A., & Fernández Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15(12), 8813–8826. <http://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules15128813>
- Garzón, V. (2017). Tendencias en alimentación y bebidas para 2018 - AINIA. Retrieved May 30, 2018, from <http://www.ainia.es/tecnoalimentalia/consumidor/tendencias-alimentos-bebidas-2018/>
- Goller, S., Peterbauer, C. K., Strauss, J., Galhaup, C., & Haltrich, D. (2002). Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions a. *Microbiology*, 148(7), 2159–2169. <http://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2159>
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., den Broeck, I. Van, & Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 197–203. [http://doi.org/10.1016/S0924-2244\(98\)00039-9](http://doi.org/10.1016/S0924-2244(98)00039-9)
- Hou, Z., Feng, Y., Wei, S., & Wang, Q. (2014). Effects of Curing Treatment on the Browning of Fresh-cut Potatoes. *American Journal of Potato Research*, 91(6), 655–662. <http://doi.org/10.1007/s12230-014-9396-6>
- Ishige, K., Schubert, D., & Sagara, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(4), 433–446. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00498-6](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00498-6)
- Konica Minolta. (n.d.). Entendiendo El Espacio de Color CIE L*A*B*. Retrieved May 4, 2018, from <http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>
- Kuijpers, T. F. M., van Herk, T., Vincken, J.-P., Janssen, R. H., Narh, D. L., van Berkel, W. J. H., & Gruppen, H. (2014). Potato and Mushroom Polyphenol Oxidase Activities Are Differently Modulated by Natural Plant Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(1), 214–221. <http://doi.org/10.1021/jf4043375>
- Kuzma, P., Druzynska, B., & Obiedzinski, M. (2014). Optimization of extraction conditions of some polyphenolic compounds from parsley leaves (*Petroselinum crispum*). *ACTA Scientiarum Polonorum*, 13(2), 145–154.
- Laurila, E., Kervinen, R., & Ahvenainen, R. (1998). The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. *Postharvest News and Information*, 9(4), 53–66.
- Limbo, S., & Piergiovanni, L. (2006). Shelf life of minimally processed potatoes: Part 1. Effects of high oxygen partial pressures in combination with ascorbic and citric acids on enzymatic browning. *Postharvest Biology and Technology*, 39(3), 254–264.

- <http://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2005.10.016>
- Luthria, D. L., Mukhopadhyay, S., & Kwansa, A. L. (2006). A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(9), 1350–1358. <http://doi.org/10.1002/jsfa.2521>
- Marín, I., Sayas-Barberá, E., Viuda-Martos, M., Navarro, C., & Sendra, E. (2016). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Organic Fennel, Parsley, and Lavender from Spain. *Foods*, 5(1).
- Marszałek, K., Kruszewski, B., Woźniak, Ł., & Skąpska, S. (2017). The application of supercritical carbon dioxide for the stabilization of native and commercial polyphenol oxidases and peroxidases in cloudy apple juice (cv. Golden Delicious). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 39(Supplement C), 42–48. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.11.006>
- Marszałek, K., Krzyżanowska, J., Woźniak, Ł., & Skąpska, S. (2017). Kinetic modelling of polyphenol oxidase, peroxidase, pectin esterase, polygalacturonase, degradation of the main pigments and polyphenols in beetroot juice during high pressure carbon dioxide treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 85(Part B), 412–417. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.018>
- Merino Antón, G. (2017). *Estudio de nuevos productos naturales como el maíz, la canela o el perejil y sus posibles sinergias como antiparadeantes en patatas mínimamente procesadas cv Monalisa*. Universidad Pública de Navarra.
- Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130(4), 986–993. <http://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.07.117>
- Murov, S. L. (n.d.). Properties of Organic Solvents. Retrieved February 28, 2018, from <http://murov.info/orgsolvents.htm#TABLE 2>
- O'Leary, E., Gormley, T. R., Butler, F., & Shilton, N. (2000). The Effect of Freeze-chilling on the Quality of Ready-meal Components. *LWT - Food Science and Technology*, 33(3), 217–224. <http://doi.org/10.1006/FSTL.2000.0645>
- Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A.-J. (2013). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36–60. <http://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>
- Pérez, B. (2016). Tendencias en el desarrollo de productos de alimentación para 2017 - AINIA. Retrieved May 30, 2018, from <http://www.ainia.es/tecnoalimentalia/consumidor/tendencias-en-el-desarrollo-de-productos-de-alimentacion-para-2017/>
- Priecina, L., & Karlina, D. (2013). Total Polyphenol, Flavonoid Content and Antiradical Activity of Celery, Dill, Parsley, Onion and Garlic Dried in Conventive and Microwave-Vacuum Dryers. *2nd International Conference on Nutrition and Food Sciences*, 53. <http://doi.org/10.7763/IPCBE>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <http://doi.org/10.1021/jf0502698>

- Rico, D., Martín-Diana, A. B., Barat, J. M., & Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(7), 373–386. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.03.011>
- Sahar M., K. (2014). Effect of microwave treatment on some bioactive compounds of parsley (*Petroselinum crispum*) and dill (*Anethum graveolens*) leaves. *Global Journal of Agriculture and Food Sciences Research*, 1(1), 28–37.
- Severini, C., Baiano, A., Pilli, T. De, Romaniello, R., & Derossi, A. (2003). Prevention of enzymatic browning in sliced potatoes by blanching in boiling saline solutions. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 657–665. [http://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00085-9](http://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00085-9)
- Stan, M., Soran, M.-L., Varodi, C., & Lung, I. (2012). Extraction And Identification Of Flavonoids From Parsley Extracts By HPLC Analysis. *AIP Conference Proceedings*, 1425, 50–52. <http://doi.org/10.1063/1.3681964>
- Tien, C., Vachon, C., Mateescu, M. -A., & Lacroix, M. (2001). Milk Protein Coatings Prevent Oxidative Browning of Apples and Potatoes. *Journal of Food Science*, 66(4), 512–516. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04594.x>
- Toivonen, P. M. A., & Brummell, D. A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 1–14.
- Vernekar, M., & Lele, S. S. (2009). Laccase: Properties and applications. *BioResources*, 4(4), 1694–1717.
- Vidal, N. (2015). Alimentación saludable, la gran tendencia de consumo actual. 7 claves orientativas - AINIA. Retrieved May 30, 2018, from <http://www.ainia.es/tecnoalimentalia/consumidor/alimentacion-saludable-la-gran-tendencia-de-consumo-actual-7-claves-orientativas/>
- Waltz, E. (2015). USDA approves next-generation GM potato. *Nature Biotechnology*, 33, 12. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0115-12>
- Whitaker, J. R., & Lee, C. Y. (1995). Recent Advances in Chemistry of Enzymatic Browning. *American Chemical Society*, 1–7. <http://doi.org/10.1021/bk-1995-0600.ch001>
- Yoruk, R., & Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361–422. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2003.tb00289.x>

9 Anexo

9.1 Preparación de la recta patrón de Trolox

Para preparar la recta patrón de Trolox (Fig. 19) se emplearon distintas concentraciones de este reactivo (0, 25, 50, 100, 200, 40 y 500 $\mu\text{mol/l}$).

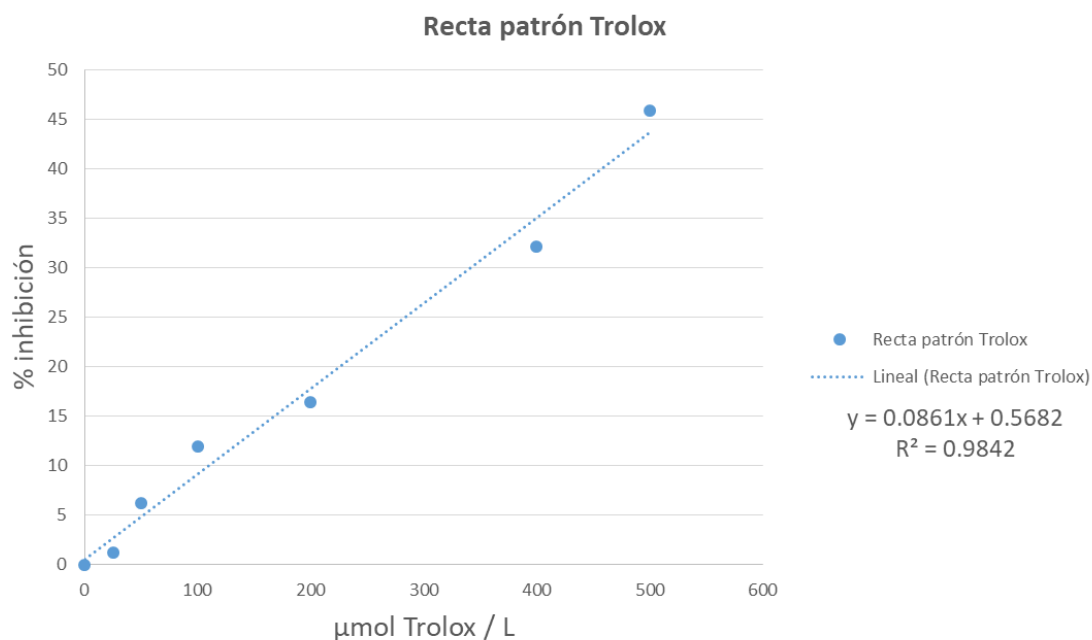


Fig. 19 Recta patrón de Trolox

9.2 Preparación de la recta patrón de ácido gálico

Para preparar la recta de calibrado de ácido gálico (Fig. 20) se utilizaron patrones de esta sustancia de concentraciones de 10, 20, 50, 100 y 200 ppm.

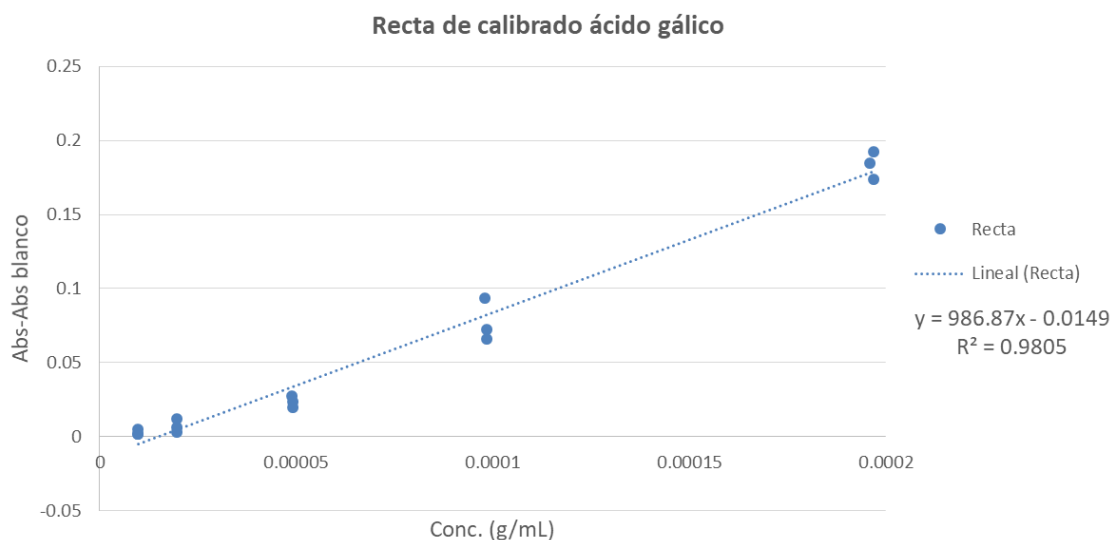


Fig. 20 Recta de calibrado del ácido gálico

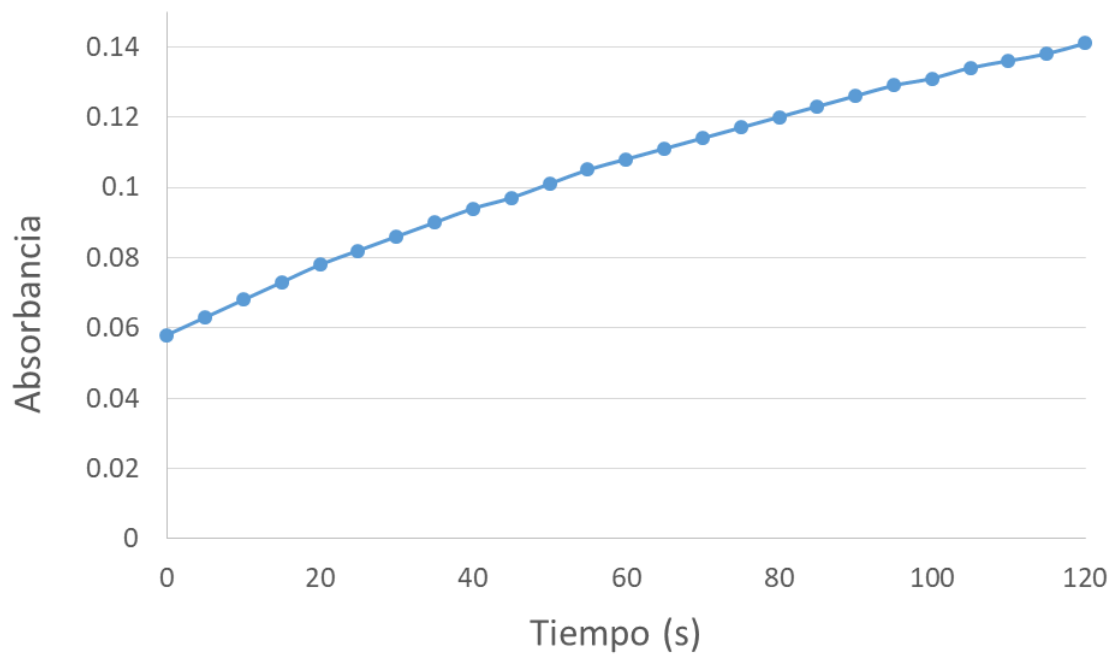


Fig. 21 Evolución de la absorbancia de la enzima PPO a 400 nm